



**Regulación diferencial del metabolismo de mRNAs por
los complejos LSM en la tolerancia a estreses abióticos
en *Arabidopsis thaliana***

TESIS DOCTORAL
Peterson Cristian Carrasco López

Directores
Julio Salinas Muñoz
Rafael Catalá Rodríguez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Regulación diferencial del metabolismo de mRNAs por los
complejos LSM en la tolerancia a estreses abióticos en
*Arabidopsis thaliana***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Peterson Cristian Carrasco López

Directores

**Julio Salinas Muñoz
Rafael Catalá Rodríguez**

Madrid, 2018

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS DOCTORAL

**Regulación diferencial del metabolismo de mRNAs por
los complejos LSM en la tolerancia a estreses abióticos
en *Arabidopsis thaliana***

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Peterson Cristian Carrasco López

Trabajo realizado en el Departamento de Biología Medioambiental del
Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC de Madrid, bajo la dirección
del Doctor Julio Salinas Muñoz y del Doctor Rafael Catalá Rodríguez

VºBº de los directores de la tesis

VºBº del tutor de la tesis

Julio Salinas Muñoz

Rafael Catalá Rodríguez

César Benito Jiménez

Peterson Cristian Carrasco López

Madrid, 2017

Este libro representa el fin de una etapa muy importante en mi vida y quiero dejar pública constancia de mi gratitud, aunque sea de manera muy breve, a todos los que de una u otra manera me han acompañado a lo largo de este viaje.

En primer lugar, quiero dar las gracias al Dr. Julio Salinas por permitirme realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Por su trabajo, apoyo y dedicación. También quiero agradecer al Dr. Rafael Catalá por la co-dirección de esta tesis y por todo el trabajo conjunto que hemos realizado estos años. Asimismo, no puedo dejar de agradecer al Dr. César Benito por toda la ayuda que me ha brindado desde que lo conocí.

En segundo lugar, pero no menos importante, a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, los que están y los que ya se han ido. Quiero señalar especialmente al Dr. Javier Barrero por todos los momentos compartidos y por darme siempre otro punto de vista, tanto laboral como personal.

También quiero agradecer a David Abia del CBMSO por toda la ayuda con los análisis bioinformáticos.

Ahora toca el turno al grupo de los *Matamala*, gracias chicos por todos esos momentos de risas y penas que hemos pasado juntos. También a todos los miembros del equipo de fútbol CIB Athletic, por todas las pachangas y terceros tiempos que hemos disfrutado. A mis amigos de Torre, Elena, Edu y Roberto. Muchas gracias por todas las experiencias que hemos compartido a lo largo de estos años. Y no podría olvidarme de Marcos, mi gran amigo desde hace tanto tiempo.

A todos los que hacen que los servicios del CIB sean una maravilla. En especial, gracias Mónica y Pablo por todas las fotos y clases particulares de Photoshop, Illustrator y demás artilugios; Maite y Gema, gracias por la inmensa ayuda a la hora de trabajar en el microscopio confocal.

A mi familia política por su inmenso cariño; a todos: los abuelos, los tíos, los primos, los sobrinos y, especialmente, a Pilar. Gracias por hacerme sentir uno más de *Los Rodríguez*. Jose, muchas gracias por ser el autor de la portada de mi tesis.

Ahora toca moverse de continente, gracias al Profesor Xavier Jordana de la Pontificia Universidad Católica de Chile por guiarme en los primeros pasos de mi camino en la Ciencia y transmitir su buena educación, su sencillez, su profesionalidad y su dedicación. A todos mis amigos y compañeros chilenos, en especial a los *Deuterostomando*.

A mis padres, Leo y Mario, y mis hermanas, Fran y Javi, porque, a pesar de la distancia, son un pilar fundamental en mi vida. Gracias por el apoyo y comprensión que siempre me han brindado. Gracias también al resto de mi familia, Paolo, Andy, Anto, tíos, abuela y abuelo. ¡Cuánto los extraño!

A Cris, por ser mi compañera de vida. Por tu lucidez, energía y actitud. Gracias por quererme tal cual soy y hacerme feliz cada día. Sin ti, este camino hubiese sido, indudablemente, mucho más difícil.

A mis padres y hermanas

A Cris

ÍNDICE

Índice

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Mecanismos de regulación postranscripcional de la expresión génica en la respuesta de las plantas a estrés abiótico	17
1.1.1. Control de la estabilidad de los mRNAs	18
1.1.1.1. Deadenilación de los mRNAs	18
1.1.1.2. Degradación de los mRNAs en dirección 3'-5'	18
1.1.1.3. Degradación de los mRNAs en dirección 5'-3'	19
1.1.2. Control del <i>splicing</i> de los pre-mRNAs	20
1.2. Las proteínas LSM	21
1.2.1. Las proteínas LSM de Arabidopsis	22
1.2.1.1. El complejo LSM1-7	23
1.2.1.2. El complejo LSM2-8	24
1.3. Planteamiento de la tesis e hipótesis de trabajo	25
1.4. Objetivos de la tesis	25

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	29
2.2. Tratamientos experimentales	29
2.3. Estudios de localización subcelular mediante microscopía láser confocal	30
2.4. Análisis de inmunodetección de proteínas	30
2.5. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa	31
2.6. Análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva	31
2.7. Detección y análisis de eventos de <i>splicing</i> alternativo	32
2.8. Cuantificación de mRNAs con estructura 5'CAP	33
2.9. Inmunoprecipitación de RNA <i>in vivo</i>	33
2.10. Cuantificación de la concentración de ABA	34
2.11. Análisis estadísticos	34
2.12. Análisis de ontología génica	35
2.13. Programas informáticos	35
2.14. Repositorio de datos	35

3. RESULTADOS

3.1. Las proteínas LSM1 de Arabidopsis se acumulan diferencialmente en respuesta a distintos estreses abióticos	39
---	----

3.2. Las proteínas LSM1 de Arabidopsis se localizan en <i>P-bodies</i> y son esenciales para el ensamblaje de estos corpúsculos citoplásmicos en respuesta a estrés abiótico	40
3.3. El complejo LSM1-7 regula diferencialmente la tolerancia de Arabidopsis a distintos tipos de estrés abiótico	41
3.4. El complejo LSM1-7 de Arabidopsis regula diferencialmente la expresión génica en respuesta a distintos estreses abióticos	43
3.5. El complejo LSM1-7 regula la degradación de diferentes transcritos implicados en la tolerancia de Arabidopsis a estrés abiótico, dependiendo de las condiciones de estrés	47
3.6. El complejo LSM1-7 de Arabidopsis regula diferencialmente la biosíntesis de ABA en respuesta a diferentes estreses abióticos	50
3.7. La proteína LSM8 y el U6 snRNA se acumulan diferencialmente en respuesta a distintos estreses abióticos en Arabidopsis	52
3.8. El complejo LSM2-8 regula diferencialmente la tolerancia de Arabidopsis a distintos estreses abióticos	54
3.9. El complejo LSM2-8 de Arabidopsis controla diferencialmente el <i>splicing</i> constitutivo y alternativo de pre-mRNAs en respuesta a distintos tipos de estrés abiótico	56
3.10. El complejo LSM2-8 controla el <i>splicing</i> de intrones específicos de pre-mRNAs implicados en la tolerancia de Arabidopsis al estrés abiótico, dependiendo de las condiciones de estrés	59
 4. DISCUSIÓN	
4.1. Implicación del complejo citoplásmico LSM1-7 en la respuesta de Arabidopsis a diferentes estreses abióticos	67
4.2. El complejo LSM2-8 de Arabidopsis regula el <i>splicing</i> de pre-mRNAs específicos en respuesta a diferentes estreses abióticos	69
 5. CONCLUSIONES	79
 6. BIBLIOGRAFÍA	83
 7. ANEXO I: ABREVIATURAS	95
 8. RESUMEN	101
 9. SUMMARY	107

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Las plantas, a diferencia de otros seres vivos, se caracterizan por ser organismos sésiles, lo que ha provocado que a lo largo de la evolución hayan adquirido mecanismos muy sofisticados para percibir el medio ambiente y activar rápidamente las respuestas adecuadas que les permiten adaptarse y sobrevivir a su entorno. Entre los factores ambientales que afectan más negativamente el desarrollo de las plantas y su distribución geográfica, se encuentran la sequía, la salinización de los suelos y las temperaturas extremas. Además, estas condiciones ambientales son responsables de más del 50% de las pérdidas en la mayor parte de los cultivos (Bray, 2000; Boyer, 1982). Comprender los mecanismos moleculares que controlan las respuestas de las plantas a estos estreses abióticos, por tanto, tiene un elevado interés tanto básico como aplicado. A nivel básico, para entender como las plantas se desarrollan y reproducen. A nivel aplicado, para desarrollar herramientas moleculares que se puedan aplicar en programas de mejora.

Las respuestas de las plantas a la sequía, la salinidad o las temperaturas bajas, están caracterizadas por numerosos cambios fisiológicos y bioquímicos, entre los que cabe destacar la reestructuración de la composición lipídica de las membranas celulares, la reordenación de los flujos de agua, el aumento de solutos compatibles u osmoprotectores, la disminución de la tasa fotosintética, la acumulación de pigmentos fotoprotectores y el aumento de la actividad antioxidativa (Mahajan, 2005). Estudios en *Arabidopsis* han puesto de manifiesto que la mayor parte de estos cambios están controlados a través de cambios en la expresión génica. En los últimos años, una serie de resultados han revelado que la regulación a nivel postranscripcional juega un papel muy relevante en el control de esos cambios (Seki, 2001; Kreps, 2002; Shinozaki, 2003). A continuación, se revisan los resultados más significativos.

1.1. Mecanismos de regulación postranscripcional de la expresión génica en la respuesta de las plantas a estrés abiótico

La población de RNAs mensajeros (mRNAs) está regulada muy finamente, tanto cuantitativamente como cualitativamente, en varias etapas durante el proceso de maduración de sus precursores (pre-mRNAs). Entre los mecanismos que regulan el proceso de maduración, el control de la estabilidad de mRNAs y del *splicing* de pre-mRNAs han emergido en los últimos años como aspectos clave en la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Floris, 2009; Nakaminami, 2011; Mazzucotelli, 2008).

1.1.1. Control de la estabilidad de los mRNAs

La modulación de la estabilidad de los mRNAs es un punto de control crítico en la regulación de la expresión génica. En eucariotas, la degradación de mRNAs comienza con la deadenilación de sus extremos 3'. Después del acortamiento de la cola de poli (A), los transcritos pueden ser degradados en dirección 3'-5' por el exosoma o sufrir la escisión en el extremo 5' de la caperuza N7-metilguanosina (5'CAP) por la maquinaria de *decapping* y ser degradados en dirección 5'-3' mediante la acción de exoribonucleasas (Zhang, 2017; Schoenberg, 2012; Garneau, 2007; Siwaszek, 2014). Recientemente, diferentes trabajos han descrito que componentes de la maquinaria de degradación de mRNAs participan en el desarrollo adecuado de la respuesta de las plantas frente al estrés abiótico.

1.1.1.1. Deadenilación de los mRNAs

En eucariotas, la degradación de mRNAs tiene lugar, principalmente, en el citoplasma y comienza con la digestión gradual de la cola de poli (A) en el extremo 3', un proceso conocido como deadenilación. Este proceso está controlado por las enzimas deadenilasas *Poly (A) ribonuclease (PARN)*, *Poly (A) Nuclease (PAN)* y el complejo *Carbon Catabolyte Repressor 4/CCR4-Associated Factor 1/NOT (CCR4/CAF1/NOT)* (Abbasi, 2013). El genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes homólogos a *CCR4* de levaduras, *AtCCR4a* y *ATCCR4b*, que codifican proteínas que solo han sido implicadas en el metabolismo de almidón y sacarosa (Suzuki, 2015). Además, en plantas todavía no se han caracterizado funcionalmente las proteínas NOT y PAN. Si se ha descrito, sin embargo, que el genoma de *Arabidopsis* contiene un gen que codifica una proteína deadenilasa, *AtPARN*, homóloga a *PARN* de levaduras, que es esencial para la correcta deadenilación de un conjunto de transcritos que se acumulan durante el desarrollo embrionario (Chiba, 2004; Reverdatto, 2004). Se ha determinado que los niveles de expresión de *AtPARN* aumentan en respuesta a estrés osmótico y salino, y a la hormona ácido abscísico (ABA) (Nishimura, 2005). No obstante, aún no se ha analizado su implicación en la tolerancia de *Arabidopsis* a estreses abióticos. Finalmente, en *Arabidopsis* se han identificado 11 genes *AtCAF1* y se ha demostrado que uno de ellos, *AtCAF1a*, codifica un regulador negativo de la tolerancia al estrés salino (Walley, 2010).

1.1.1.2. Degradación de los mRNAs en dirección 3'-5'

Una vez que las deadenilasas han digerido la cola de poli (A) de los mRNAs, estos son degradados exonucleolíticamente por dos vías principales. La primera vía degrada el RNA

en la dirección 3'-5' por la acción de un complejo multiproteico denominado exosoma (Chlebowski, 2013; Houseley, 2006). Este complejo está formado por nueve subunidades centrales y una serie de proteínas asociadas que incluyen proteínas de unión a RNA (RBPs) y helicasas de RNA que confieren especificidad en el reconocimiento de sus RNAs diana (Thoms, 2015). Aunque se ha descrito que algunas proteínas que conforman el exosoma regulan diversos aspectos fisiológicos de las plantas como la acumulación de cera cuticular, la tasa de germinación, la embriogénesis y el desarrollo del gametofito femenino, su participación en el control de la respuesta de las plantas al estrés abiótico no ha sido demostrada (Yang, 2013).

1.1.1.3. Degradación de los mRNAs en dirección 5'-3'

En eucariotas, la segunda vía implicada en la degradación de mRNAs se produce en la dirección 5'-3' mediante la acción de exoribonucleasas (XRN). Esta vía está precedida por la escisión de la estructura 5'CAP a través del complejo de *decapping*, produciendo mRNAs con nucleótidos monofosfato en su extremo 5' que son los sustratos preferidos de las XRNs (Siwaszek, 2014; Kastenmayer, 2000). Se ha demostrado que el proceso de *decapping* y la posterior degradación de los mRNAs tiene lugar en sitios concretos del citoplasma, denominados corpúsculos de procesamiento (*P-bodies*), donde confluyen mRNAs y factores de degradación (Madonado-Bonilla, 2014; Sheth, 2003; Decker, 2012). El complejo de *decapping* está formado por la enzima Decapping 2 (DCP2), que tiene la actividad *decapping*, y diferentes proteínas activadoras, entre las que se encuentran, DCP1, DCP5, Varicose (VCS), Protein associated with topoisomerase II (PAT1) y el complejo heteroheptamérico de proteínas LSM (SM-Like proteins), LSM1-7 (Xu, 2006; Xu, 2009; Roux, 2015; Perea-Resa, 2012; Golisz, 2013; Goeres, 2007). Recientemente se ha descrito que, en condiciones de estrés osmótico, la fosforilación de DCP1 por la proteína quinasa 6 activada por mitógenos (MPK6) desencadena su dimerización y asociación con DCP5. Esta asociación controla tanto la degradación de mRNAs que son inducibles por estrés osmótico como la adaptación de las plantas a dicho estrés (Xu, 2012). DCP1 también interacciona con la proteína de Arabidopsis BDCP SPIRRIG (SPI) en los *P-bodies*, una proteína necesaria para el ensamblaje de estos en condiciones de alta salinidad. SPI funciona como un regulador positivo de la tolerancia de Arabidopsis a estrés salino controlando la degradación de mRNAs regulados por este estrés (Steffens, 2012). Además, se ha demostrado que el complejo LSM1-7 también puede controlar la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Perea-Resa, 2016). Estos resultados serán descritos con mayor detalle en la sección 1.2 de esta Introducción.

Finalmente, se ha demostrado que la exoribonucleasa XRN4 de *Arabidopsis* regula positivamente la tolerancia de las plantas a temperaturas moderadamente altas a través de la degradación de mRNAs (Merret, 2013).

1.1.2. Control del *splicing* de los pre-mRNAs

Además de la degradación de los mRNAs, la maduración de los pre-mRNAs también parece estar implicada en el control de la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Floris, 2009; Nakaminami, 2011; Mazzucotelli, 2008). En *Arabidopsis*, cerca del 90% de los genes que codifican proteínas contienen intrones (Reddy, 2013; Staiger, 2013; Filichkin, 2010). Por tanto, un paso clave en la expresión génica es la eliminación de los intrones y el posterior ligamiento de los exones a través de un proceso denominado *splicing*. Este proceso está catalizado por el espliceosoma, una maquinaria ribonucleoproteica (RNP) altamente conservada en eucariotas compuesta por cinco complejos RNPs nucleares pequeños (snRNPs) y más de 200 proteínas adicionales (Wahl, 2009; Matera, 2014). Cada snRNP está compuesto de un RNA nuclear pequeño (snRNA) rico en uridina (U1, U2, U4, U5 y U6 snRNAs) y sus correspondientes proteínas asociadas que permiten clasificarlos en dos grupos. En el primero de ellos se incluyen U1, U2, U4 y U5 snRNPs, cuyos snRNAs interactúan con el complejo multiproteico Sm. El segundo grupo está formado únicamente por el U6 snRNP, cuyo snRNA interactúa con el complejo heteroheptamérico LSM2-8.

En los últimos años, el control de la actividad del espliceosoma se está revelando como un aspecto central en la modulación del patrón de la expresión génica en eucariotas. Así, por ejemplo, se ha descrito que a partir de un mismo gen se pueden generar dos o más isoformas de mRNA maduro a través de un proceso denominado *splicing* alternativo (SA) (Smith, 1989; Lee, 2015; Staiger, 2015). Este mecanismo se lleva a cabo utilizando diferentes combinaciones de sitios de *splicing* presentes en los pre-mRNAs, generando, por ende, un ensamblaje variable de exones e intrones. Se ha determinado que cerca del 60% de los pre-mRNAs de los genes que contienen intrones pueden sufrir SA en *Arabidopsis* (Reddy, 2013). El SA no solo aumenta la diversidad del proteoma a través de la generación de nuevas proteínas con diferentes funciones o localización subcelular, sino que también puede regular los niveles de mRNAs mediante la introducción de codones de terminación prematuros provocando la degradación de estos por la vía del *nonsense-mediated decay* (NMD) (Nilsen, 2010; Staiger, 2013). Hasta el momento, se ha asumido que un correcto patrón de *splicing* requiere la acción combinada de secuencias en *cis* presentes en los pre-mRNAs y un gran número de proteínas no espliceosomales actuando en *trans*. Entre estas

últimas se encuentran las proteínas ricas en residuos de Serina/Arginina (SR) y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNP) que, generalmente, promueven o impiden el reclutamiento del espliceosoma a sitios particulares de *splicing*, respectivamente (Lee, 2015).

Estudios a nivel genómico han revelado que numerosos pre-mRNAs de plantas sufren SA en condiciones de estrés abiótico. Por ejemplo, Leviatan y colaboradores analizaron los cambios globales en el *splicing* de pre-mRNAs en respuesta a temperaturas bajas, desvelando que 219 de ellos sufren SA (Leviatan, 2013). Asimismo, Ding y colaboradores han descrito que el 49% de todos los genes que contienen intrones sufren SA en condiciones de alta salinidad (Ding, 2014). Estos resultados sugieren que el SA constituye una parte integral de la regulación génica en respuesta a estrés ambiental y, más importante, que el control del SA podría jugar un papel significativo en la adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas (Filichkin, 2015). Recientemente, se ha demostrado que las proteínas espliceosomales también participan en la regulación de la respuesta de Arabidopsis al estrés abiótico a través del control del *splicing*. Se ha puesto de manifiesto que las proteínas del espliceosoma de Arabidopsis codificadas por los genes *PRECURSOR RNA PROCESSING FACTOR 31 (PRP31)* (Du, 2015), *STABILIZED1 (STA1)* (Lee, 2006), *REGULATOR OF CBF EXPRESSION 1 (RCF1)* (Guan, 2013), *SKI-INTERACTING PROTEIN (SKIP)* (Feng, 2015), *GEMIN2* (Schlaen, 2015) y *RDM16* (Huang, 2013) regulan la tolerancia de las plantas a distintos estreses abióticos controlando el correcto *splicing* de varios pre-mRNAs que codifican importantes reguladores implicados en la respuesta a estos estreses. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio, han desvelado que el complejo LSM2-8 controla la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Hernández-Verdeja, 2015). Estos datos serán expuestos en detalle en la siguiente sección de esta Introducción.

1.2. Las proteínas LSM

Anteriormente, ya se ha mencionado la implicación de las proteínas LSM tanto en el control del metabolismo de mRNAs como en el control de la respuesta de las plantas al estrés abiótico. Dado que esta tesis está centrada en el estudio de la implicación de los complejos LSM en la tolerancia de las plantas a diferentes estreses abióticos, a continuación, se describen los resultados más sobresalientes que hasta la fecha se han publicado sobre la función de estos complejos en Arabidopsis.

Las proteínas LSM pertenecen a la familia de las Sm que está altamente conservada a lo largo de la evolución en términos de secuencia y función. Tienen bajo peso molecular (10-25 kDa) y presentan un dominio, denominado SM, que consiste en dos motivos, Sm1 y Sm2, separados por una región variable (Tharun, 2009). Estos motivos permiten a las LSM interactuar entre ellas para formar diferentes complejos hexaméricos o heptaméricos con capacidad de unir RNAs de cadena sencilla. Las proteínas LSM han sido caracterizadas en varios organismos eucariotas, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma brucei*, *Xenopus laevis* y *Homo sapiens* (Beggs, 2005; Tharun, 2009). En estos organismos, existen ocho proteínas LSM principales que están organizadas en dos complejos heteroheptaméricos con forma de anillo. Uno de ellos, formado por las proteínas LSM1 a LSM7 (LSM1-7), se localiza en el citoplasma, mientras que el otro, formado por las proteínas LSM2 a LSM8 (LSM2-8), es de localización nuclear. A diferencia de las proteínas LSM1 y LSM8 que definen y confieren la especificidad a cada complejo, las otras proteínas (LSM2 a LSM7) forman parte tanto del complejo citoplásmico como del nuclear. En levaduras y animales, el complejo LSM1-7 interactúa con mRNAs oligoadenilados para activar su *decapping* y consiguiente degradación por la exoribonucleasa XRN1. También se ha descrito que la unión del complejo LSM1-7 a mRNAs oligoadenilados podría protegerlos de su degradación por el exosoma y que este complejo está asociado, fundamentalmente en situaciones de estrés, a los *P-bodies*. Por otra parte, el complejo LSM2-8 participa en el *splicing* de pre-mRNAs interactuando con el tramo poli (U) del U6 snRNA para estabilizarlo. Este complejo forma el componente proteico principal del U6 snRNP (Mayes, 1999; Bouveret, 2000; Tharun, 2000). Además de las proteínas LSM1 a LSM8, distintos análisis bioinformáticos han permitido identificar nuevas proteínas con dominio SM, LSM9 a LSM16. Aunque las funciones de estas nuevas proteínas LSM aún no están bien establecidas, se postula que algunas de ellas podrían participar en el control de la traducción de mRNAs o en la formación de *P-bodies* (Tharun, 2009).

1.2.1. Las proteínas LSM de Arabidopsis

El genoma de *Arabidopsis* contiene 42 genes que podrían codificar proteínas con motivos Sm. Sin embargo, ha sido solo recientemente que las proteínas LSM se han caracterizado molecular y funcionalmente (Perea-Resa, 2012; Golisz, 2013). Las ocho proteínas LSM canónicas de levaduras y animales, LSM1 a LSM8, están codificadas en *Arabidopsis* por 11 genes, ya que *LSM1*, *LSM3* y *LSM6* están duplicados y codifican pares de proteínas funcionalmente redundantes (LSM1A, B; LSM3A, B y LSM6A, B). Al igual que en otros eucariotas, las LSM de *Arabidopsis* están organizadas, al menos, en dos complejos

heteroheptaméricos independientes, uno de localización citoplasmática (LSM1-7) y otro de localización nuclear (LSM2-8) (Perea-Resa, 2012; Golisz, 2013).

1.2.1.1. El complejo LSM1-7

El análisis de un mutante doble de pérdida de función para *LSM1A* y *LSM1B*, denominado *lsm1a lsm1b*, puso de manifiesto que la proteína LSM1 de Arabidopsis, al igual que en otros eucariotas, es esencial tanto para la formación del complejo LSM1-7 como para el ensamblaje de los *P-bodies* (Perea-Resa, 2012). Los mutantes *lsm1a lsm1b* presentan un patrón de desarrollo alterado, desde la germinación hasta la floración y formación de las semillas (Perea-Resa, 2012). Como era de esperar, dado el papel del complejo LSM1-7 de activador de DCP2, los mutantes *lsm1a lsm1b* presentan numerosos mRNAs con estructura 5'CAP, lo que da lugar a su estabilización (Perea-Resa, 2012; Golisz, 2013). El complejo LSM1-7, por tanto, constituye un componente clave de la maquinaria de *decapping* que activa la escisión de estructuras 5'CAP en mensajeros correspondientes a un grupo particular de genes implicados en el desarrollo de Arabidopsis, facilitando su posterior degradación en dirección 5'-3'.

Por otra parte, un trabajo reciente de nuestro laboratorio ha revelado la participación del complejo LSM1-7 de Arabidopsis en el control del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Perea-Resa, 2016), un proceso adaptativo mediante el cual algunas plantas pueden incrementar su tolerancia a la congelación tras ser expuestas a temperaturas entre 0 y 10°C (Levitt, 1980, Thomashow, 1999). En condiciones de frío (4°C), los transcritos *LSM1A* y *LSM1B* se acumulan, lo que, a su vez, se ve reflejado en la acumulación de las proteínas LSM1A y LSM1B en *P-bodies*. La caracterización fisiológica de las plantas mutantes *lsm1a lsm1b* puso de manifiesto que LSM1, y por tanto el complejo LSM1-7, regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis. No está implicado, sin embargo, en la tolerancia constitutiva de Arabidopsis a las heladas. Análisis transcriptómicos demostraron que el complejo LSM1-7 de Arabidopsis regula el proceso de aclimatación controlando el *decapping* y la degradación posterior de mRNAs específicos que son inducidos durante este proceso a través de la interacción directa de LSM1 con estos mensajeros (Perea-Resa, 2016). También se ha descrito que la proteína LSM5 de Arabidopsis, codificada por el gen *Supersensitive to ABA and Drought 1 (SAD1/LSM5)*, contribuiría a la degradación de mRNAs activando su *decapping* (Golisz, 2013). Además, se ha postulado que LSM5 regula positivamente la tolerancia de las plantas a estrés por calor, controlando el *decapping* de mRNAs inducidos por temperaturas altas

(Okamoto, 2016). No obstante, dado que LSM5 forma parte tanto del complejo citoplásmico LSM1-7 como del complejo nuclear LSM2-8, es difícil de establecer su función concreta en el control de la estabilidad de mRNAs.

1.2.1.2. El complejo LSM2-8

La caracterización funcional de dos mutantes de pérdida de función para *LSM8*, denominados *lsm8-1* y *lsm8-2*, permitió demostrar que la proteína LSM8 es necesaria para la formación del complejo nuclear LSM2-8 en *Arabidopsis* (Perea-Resa, 2012). El análisis fenotípico de los mutantes *lsm8* reveló que la ausencia del complejo nuclear LSM provoca graves defectos en el desarrollo de *Arabidopsis*, desde la germinación hasta la floración y fructificación (Perea-Resa, 2012). Junto con ello, se ha descrito que los mutantes *lsm8* presentan niveles reducidos de U6 snRNA, confirmando que el complejo LSM2-8 se requiere para la estabilización de este snRNA (Perea-Resa, 2012; Golisz, 2013). Además, estudios de transcriptómica en el mutante *lsm8-1* han indicado que la falta de función de LSM8 altera el *splicing* de, al menos, 65 genes específicos implicados en las distintas fases del desarrollo de *Arabidopsis* (Perea-Resa, 2012). Todos estos resultados han puesto de manifiesto que el complejo nuclear LSM de *Arabidopsis* es un componente del espliceosoma que regula el correcto desarrollo de *Arabidopsis*, controlando el *splicing* de pre-mRNAs mediante la estabilización del U6 snRNA.

En nuestro laboratorio también se ha demostrado que el complejo LSM2-8 está implicado en la respuesta de las plantas al estrés abiótico. Al igual que ocurre con los transcritos de *LSM1A* y *LSM1B*, los transcritos de *LSM8* se acumulan en condiciones de frío (Hernández-Verdeja, 2015). La caracterización fisiológica de los mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2* evidenció que la proteína LSM8, y por tanto el complejo LSM2-8, regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*, pero no está implicado en su tolerancia constitutiva a las heladas (Hernández-Verdeja, 2015). El análisis transcriptómico del mutante *lsm8-1* en condiciones de frío indicó que el complejo LSM nuclear regula la aclimatación a las temperaturas bajas controlando el *splicing* y los niveles de expresión de un grupo particular de genes cuya expresión aumenta por frío (Hernández-Verdeja, 2015). Por otro lado, se ha descrito que LSM5 regula la sensibilidad a ABA y controla positivamente la tolerancia a sequía, estrés salino y temperaturas altas en *Arabidopsis* a través del control de los niveles de expresión y del *splicing* de pre-mRNAs que codifican proteínas relacionadas con la respuesta de las plantas a estrés abiótico (Xiong, 2001; Cui, 2014b; Okamoto, 2016). La proteína LSM4 también funciona como

regulador positivo de la tolerancia a estrés salino en *Arabidopsis*, controlando el correcto procesamiento de varios genes relacionados con la respuesta a dicho estrés. Su dimetilación por la proteína Metiltransferasa 5 de argininas (PRMT5) es esencial para el ensamblaje del espliceosoma y el correcto *splicing* de pre-mRNAs en respuesta a alta salinidad (Zhang, 2011). Como se ha mencionado anteriormente, el hecho de que LSM4 y LSM5 pertenezcan a los dos complejos LSM hace difícil la interpretación de estos resultados, ya que el papel de ambas proteínas en la regulación del *splicing* podría estar más relacionado con su participación en la maquinaria de *decapping* que con su función en el espliceosoma.

1.3. Planteamiento de la tesis e hipótesis de trabajo

Las temperaturas bajas, la sequía y la salinidad son estreses abióticos altamente relacionados frente a los cuales las plantas parecen tener respuestas comunes y específicas. Recientemente, en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto que los complejos LSM regulan el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas controlando la expresión de un grupo particular de genes implicados en esta respuesta adaptativa. Además, este control parece estar mediado por la interacción de los complejos con mensajeros específicos para regular tanto su degradación como su procesamiento. Estos resultados sugieren que dichos complejos podrían participar, también, en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés hídrico y salino, y que lo podrían hacer modulando diferencialmente la expresión génica mediante la selección de transcritos determinados relacionados con la respuesta a esos estreses. Es en el contexto de esta hipótesis en la que se plantea esta tesis, para la que propusimos los siguientes objetivos.

1.4. Objetivos de la tesis

1. Determinar la implicación de los complejos LSM en la tolerancia de *Arabidopsis* a la sequía y al estrés salino.
2. Caracterizar la función molecular de los complejos LSM en la respuesta de *Arabidopsis* a la sequía y al estrés salino.
3. Determinar la capacidad de los complejos LSM para seleccionar mensajeros diana específicos, dependiendo de las condiciones de estrés ambiental.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. Materiales y Métodos

2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

En todos los experimentos se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh del ecotipo Columbia-0 (Col-0) como genotipo silvestre. Las líneas mutantes *lsm1a lsm1b*, *lsm8-1* y *lsm8-2*, las líneas transgénicas *LSM1A_{PRO}:LSM1A:GFP* (*c-lsm1a*), *LSM1B_{PRO}:LSM1B:GFP* (*c-lsm1b*), *LSM8_{PRO}:LSM8:GFP* (*c-lsm8*), las plantas *c-lsm1a* y *c-lsm1b* conteniendo la construcción *35S:RFP:DCP1* y las plantas *lsm1a lsm1b* conteniendo las construcciones *35S:GFP:DCP2* o *35S:GFP:VCS* han sido descritas previamente (Perea-Res, 2012). La línea transgénica de *Arabidopsis* que contiene la construcción *GRP7_{PRO}:GRP7:GFP* fue proporcionada por Dorothee Staiger (Universidad de Bielefeld, Alemania) (Streitner, 2012). Las plantas se cultivaron en cámaras climáticas a 20°C bajo un fotoperiodo de día largo (16 horas de luz fluorescente con un flujo de fotones de 90 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 8 horas de oscuridad). Para el cultivo en tierra, las semillas se sembraron en macetas o alvéolos de plástico que contenían una mezcla de sustrato orgánico (50% turba roja y 50% turba negra) y vermiculita (3:1 v/v) esterilizada previamente. Tras la siembra, las macetas o alvéolos se colocaron en bandejas cubiertas con plástico transparente para mantener la humedad adecuada y evitar contaminaciones durante la germinación. Las plantas fueron regadas dos veces por semana con agua destilada. Para el cultivo *in vitro*, las semillas se esterilizaron previamente con 5% hipoclorito sódico durante cinco minutos y se lavaron con agua destilada estéril cuatro veces. Las semillas se sembraron en placas Petri conteniendo medio *Murashige* y *Skoog* 0,5X (2,35 g/L de MS (Duchefa); 0,5 g/L de MES y pH 5,7) suplementado con 1% (p/v) de sacarosa y solidificado con 0,9% (p/v) de Plantagar (medio GM). Las placas posteriormente se sellaron con cinta 3M *Micropore*. En todos los casos, las semillas se estratificaron a 4°C durante 48 horas en oscuridad.

2.2. Tratamientos experimentales

Los tratamientos con temperaturas bajas se realizaron poniendo plantas de dos semanas de edad cultivadas en tierra en cámaras climáticas ajustadas a 4°C bajo un fotoperiodo de día largo con un flujo de fotones de 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los tratamientos de estrés hídrico y alta salinidad se realizaron transfiriendo plantas de dos semanas que habían crecido en posición vertical en placas Petri con medio GM sobre mallas de nailon a placas Petri que contenían medio GM suplementado con 55% (p/v) polietilenglicol (PEG) o 150 mM NaCl, respectivamente (Verslues, 2006). En cada tratamiento, el material vegetal se recogió en los tiempos indicados, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C

hasta su utilización. Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado con tres réplicas biológicas independientes.

Los ensayos de tolerancia al estrés hídrico se llevaron a cabo transfiriendo las plántulas que habían crecido durante siete días en placas con medio GM en posición vertical a nuevas placas de GM suplementadas con 25% (p/v) PEG. La tolerancia se cuantificó como el porcentaje de raíces laterales o de peso fresco de las plantas después de una semana de tratamiento con PEG con respecto a plantas cultivadas en condiciones control. La tolerancia a sequía en tierra se analizó en plantas de dos semanas de edad que habían sido cultivadas en condiciones estándar, a las que se les retiró el riego durante 10 días, tras lo que se volvieron a regar durante cinco días adicionales (Verslues, 2006). Los ensayos de tolerancia al estrés salino se realizaron transfiriendo plántulas cultivadas durante siete días en posición vertical en placas con medio GM a nuevas placas suplementadas con 150 mM NaCl. Tras una semana de tratamiento, la tolerancia se cuantificó como el porcentaje de longitud de la raíz principal o de peso fresco respecto a plantas del correspondiente genotipo que habían crecido en condiciones control. La tolerancia al estrés salino en tierra se analizó en plantas de dos semanas de edad cultivadas en condiciones estándar que fueron posteriormente regadas tres veces por semana con 250 mM NaCl durante 10 días (Verslues, 2006). En todos los casos, los ensayos de tolerancia se hicieron por triplicado con, al menos, tres réplicas biológicas independientes.

2.3. Estudios de localización subcelular mediante microscopía láser confocal

La localización subcelular de las proteínas de fusión LSM1A:GFP, LSM1B:GFP, RFP:DCP1, GFP:DCP2, GFP:VCS y LSM8:GFP se llevó a cabo mediante microscopía confocal de raíces de plántulas transgénicas de siete días de edad cultivadas *in vitro* en medio GM en condiciones estándar o expuestas durante 10 horas a 150 mM NaCl o a 55% PEG. Las observaciones y captura de imágenes se realizaron usando un microscopio confocal *Leica TCS SP5*. Las líneas de los láseres de excitación para la formación de imágenes de las proteínas quiméricas con GFP y RFP fueron 488 y 561 nm, respectivamente.

2.4. Análisis de inmunodetección de proteínas

Los extractos de proteínas totales se obtuvieron a partir de plantas Col-0, *c-lsm1a*, *c-lsm1b* y *c-lsm8* cultivadas en condiciones estándar o expuestas a 4°C, 150 mM NaCl o 55% PEG durante diferentes tiempos. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 15% y se transfirieron a membranas de PVDF Hybond-P (*Amersham*)

utilizando el sistema Mini-PROTEAN Tetra Cell (*Bio-Rad*). Como anticuerpo primario se utilizó anti-GFP de conejo (*Abcam*; n° de catálogo Ab290) y como secundario un anticuerpo IgG-HRP de cabra anti-conejo (*Santa Cruz Biotechnology*, n° de catálogo sc2030). Las señales se detectaron con el Kit de detección *ECL Western Blotting* (*Amersham*), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, las membranas se tiñeron con Azul de *Coomassie* y la señal correspondiente a la subunidad grande de la proteína Rubisco (55 kDa) se utilizó como control de carga. En todos los casos, los experimentos se realizaron por triplicado con tres réplicas biológicas independientes.

2.5. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa

El RNA total se extrajo con el reactivo TRIzol (*Life Technologies*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar el DNA genómico, el RNA se trató con DNasa I (*Roche*) durante 15 minutos a 37°C. La cuantificación del RNA se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 200 (*Thermo Scientific*). El cDNA se sintetizó con el kit *iScript[®] cDNA Synthesis* (*Bio-Rad*), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Posteriormente, este cDNA se utilizó como molde para la amplificación con el kit *SsoFast EvaGreen Supermix* (*Bio-Rad*) en un termociclador iQ2 (*Bio-Rad*) con oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla suplementaria 1). Los valores de expresión relativa se calcularon mediante el método $\Delta\Delta C_T$ (Livak, 2001) utilizando el gen *AT4G26410* como referencia (Czechowski, 2005). La cuantificación se realizó siempre por triplicado con tres réplicas biológicas independientes.

2.6. Análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva

Las muestras de RNA total extraídas como se describe en el apartado anterior se purificaron con el kit *RNeasy Plant Mini Kit* (*Qiagen*). Cada genoteca de cDNA se generó a partir de muestras que agrupaban el RNA de tres réplicas biológicas independientes. La determinación de la calidad del RNA se realizó con el sistema Bioanalyzer 2100 (*Agilent*). La preparación de las genotecas y la secuenciación posterior fue realizada por el equipo técnico del *Beijing Genome Institute-BGI* (China), utilizando una plataforma Illumina HiSeqTM 2000. Para los análisis de expresión génica se generaron, aproximadamente, 12 millones de lecturas de 50 pares de base (pb) de longitud por muestra. Las lecturas obtenidas se alinearon al genoma de referencia de *Arabidopsis* (anotación TAIR10) mediante el programa SOAP2 (Li, 2009b), obteniendo más de un 90% de lecturas alineadas. Los niveles de expresión génica se calcularon utilizando el método *Reads Per*

Kilobase per Million reads (RPKM) (Mortazavi, 2008). Los genes con expresión desregulada en las distintas muestras fueron identificados utilizando el algoritmo desarrollado por Audic & Claverie (Audic, 1997), estableciendo un umbral de expresión de ± 2 y un *False Discovery Rate* (FDR) $\leq 0,001$ como valores límites para considerar que un gen está expresado diferencialmente. Los resultados obtenidos de los experimentos de RNA-seq se validaron mediante qPCR, utilizando las parejas de oligonucleótidos correspondientes a cada uno de los genes validados (Tabla suplementaria 1), tal y como se describe en el apartado anterior.

2.7. Detección y análisis de eventos de *splicing* alternativo

Para la detección de eventos de *splicing* alternativo, la preparación de las muestras de RNA y de las genotecas, así como la posterior secuenciación de estas, se llevó a cabo como para los análisis de expresión génica. En este caso, sin embargo, se generaron 50 millones de lecturas de 91 pb de longitud por muestra. Las lecturas se alinearon con el genoma de referencia de Arabidopsis (anotación TAIR10) utilizando el programa TopHat (Trapnell, 2009) y se procesaron con el programa SAMtools (Li, 2009a). Para detectar sitios de *splicing* alternativos en 5' (SSA5'), sitios de *splicing* alternativo en 3' (SSA3') y eventos de exclusión de exón (EE), se empleó el software SplAdder (Kahles, 2016). Con el fin de minimizar la tasa de falsos positivos solo se consideraron los eventos de *splicing* alternativo definidos, por al menos, cinco lecturas en alguna de las muestras analizadas. Los eventos de retención de intrón (RI) se determinaron utilizando un programa informático desarrollado en colaboración con la Unidad de Bioinformática del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. En este programa, se definieron los intrones como aquellas regiones que están flanqueadas por dos exones y no se superponen con exones, o combinaciones de exones, anotados en TAIR10. Se consideraron como intrones retenidos únicamente aquellos que mostraban una media de más de cinco lecturas por base a lo largo de sus secuencias en, al menos, uno de los genotipos analizados. Los niveles de RI se calcularon como una relación entre los niveles de expresión de los intrones y los niveles de expresión de los genes correspondientes. Los intrones retenidos en las plantas silvestres se anotaron como intrones procesados alternativamente, mientras que los que no se encontraban en esta categoría se clasificaron como intrones procesados constitutivamente. En todos los casos (SSA5', SSA3', EE y RI), se estableció un umbral de cambio de expresión respecto a las plantas silvestres de dos veces y un valor de $Q \leq 0,05$ (calculado en base a los valores de P obtenidos mediante la prueba exacta de Fisher) como valor límite para considerar que un evento de *splicing* está significativamente alterado en uno de los genotipos analizados. Finalmente, aquellos eventos

observados exclusivamente en el mutante *lsm8-1*, que tenían una media de, al menos, cinco lecturas por base a lo largo de sus secuencias, también se consideraron como significativamente alterados y se les asignó un valor de Q igual a cero.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos de RNA-seq se validaron mediante qPCR, utilizando dos parejas de oligonucleótidos (Tabla suplementaria 1). La primera correspondía a oligonucleótidos específicos para cada evento de *splicing* alterado, y la segunda a oligonucleótidos para cuantificar los niveles de expresión de los pre-mRNAs que presentan dicha alteración. La cuantificación de cada evento de *splicing* alterado se calculó como una relación entre sus niveles de expresión y los niveles de expresión de los genes correspondientes. Los valores de expresión relativa se calcularon mediante el método $\Delta\Delta C_T$ (Livak, 2001) utilizando el gen *AT4G26410* como referencia (Czechowski, 2005). Los experimentos se realizaron siempre por triplicado empleando tres réplicas biológicas independientes.

La longitud y el contenido en GCs de intrones se calculó a partir del genoma de referencia de Arabidopsis (TAIR10). La búsqueda de motivos específicos en las secuencias de los intrones se llevó a cabo con el programa MEME (www.meme-suite.org). Las frecuencias de nucleótidos alrededor de los sitios de *splicing* 5' y 3' y del punto de ramificación se determinaron utilizando la aplicación WebLogo (<http://weblogo.threeplusone.com/>).

2.8. Cuantificación de mRNAs con estructura 5'CAP

Para este análisis, se extrajo RNA total de plantas de dos semanas de edad con el kit *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). La cuantificación se realizó mediante experimentos tipo *Rapid amplification of cDNA ends* (RACE) del extremo 5' usando el kit *First Choice RLM-RACE* (Ambion) acoplado a qPCR, siguiendo las especificaciones del fabricante. En los ensayos de qPCR se utilizó un oligonucleótido específico de cada gen junto con un oligonucleótido específico del adaptador 5' RACE incluido en el kit *First Choice RLM-RACE* (Tabla suplementaria 1). Los niveles de mRNAs con 5'CAP fueron corregidos respecto a sus niveles de expresión total determinados usando oligonucleótidos específicos (Tabla suplementaria 1). Todos estos ensayos se realizaron por triplicado utilizando tres réplicas biológicas independientes.

2.9. Inmunoprecipitación de RNA *in vivo*

Para los experimentos de inmunoprecipitación de RNA *in vivo* (RIP) se siguió el protocolo

descrito por Dorothee Staiger con modificaciones (Köster, 2014). Plantas *c-lsm1a* de dos semanas de edad que habían crecido en condiciones estándar (medio GM) o que habían sido expuestas durante 10 horas adicionales a 55% PEG o 150 mM NaCl (sección 2.2) se incubaron durante 10 minutos con una solución de 1% (v/v) formaldehído preparado con tampón fosfato salino (PBS) aplicando vacío. Posteriormente, fueron incubadas en una solución de 125 mM glicina durante cinco minutos, también con vacío. Finalmente, estas plantas fueron lavadas cuatro veces con agua destilada fría, tras lo cual se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Los extractos se prepararon incubando 500 mg de tejido pulverizado con 750 µL de tampón de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 4 mM MgCl₂; 0,1% Igepal; 5 mM DTT; 1 mM PMSF; inhibidor de proteasas (1 tableta/10 mL) y 100 U/mL de Ribolock) durante 10 minutos en hielo. Los extractos fueron clarificados tres veces mediante centrifugación a 13000 rpm durante cinco minutos a 4°C. Para inmunoprecipitar el RNA, los extractos resultantes fueron incubados durante 16 horas a 4°C con perlas GFP-Trap (*Chromotek*), tras lo cual fueron lavadas 3 veces con tampón de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 4 mM MgCl₂; 0,5% Igepal; 0,5% deoxicolato de sodio; 0,1% SDS; 2 M urea y 2 mM DTT). A continuación, el RNA inmunoprecipitado se extrajo con TRIzol (*Life Technologies*), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se cuantificó mediante qPCR (sección 2.5) utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla suplementaria 1). Los niveles de mRNAs en experimentos de RIP con muestras de plantas transgénicas de *Arabidopsis* expresando la fusión *GRP7_{PRO}:GRP7:GFP* se utilizaron como controles para determinar la interacción inespecífica de los mRNAs inmunoprecipitados con la proteína LSM1A:GFP. De esta manera, los niveles de cada mRNA inmunoprecipitado en extractos de plantas *c-lsm1a* fueron corregidos respecto a sus correspondientes niveles en las plantas control *GRP7_{PRO}:GRP7:GFP*. Todos los experimentos se realizaron por triplicado usando tres réplicas biológicas independientes.

2.10. Cuantificación de la concentración de ABA

Los niveles de ABA se determinaron en plantas Col-0, *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* de dos semanas de edad cultivadas en condiciones estándar (medio GM) o expuestas durante 10 horas adicionales a 55% PEG o 150 mM NaCl (sección 2.2) siguiendo el método descrito por Turečková y colaboradores (Turečková, 2009). Todas las medidas se realizaron con cuatro réplicas biológicas independientes.

2.11. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el software Prism 6 (GraphPad Software Inc., EE.UU.). Las comparaciones entre dos grupos se analizaron mediante una prueba de t de *Student*. Las comparaciones entre múltiples grupos se hicieron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, dependiendo de si se consideraron una o dos variables, respectivamente. Posteriormente, en ambos casos, se realizó un test de comparaciones múltiples mediante la prueba de *Dunnett*. Los análisis estadísticos de los estudios transcriptómicos y de la detección de eventos de *splicing* alternativo mediante RNA-seq se describen con detalle en las secciones correspondientes (secciones 2.6 y 2.7).

2.12. Análisis de ontología génica

Los análisis de ontología génica se realizaron con la herramienta *ThaleMine* de Araport (<https://apps.araport.org/thalemine/begin.do>). Los términos de ontología génica enriquecidos significativamente (valor de P menor de 0,05) se calcularon utilizando un test hipergeométrico corregido con *Holm-Bonferroni*.

2.13. Programas informáticos

El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, además del diseño de los oligonucleótidos, se llevó a cabo con el programa *Geneious* (Biomatters Ltd., NZ). La visualización de los datos de los estudios transcriptómicos se realizó con el programa *Integrative Genomics Viewer* (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>). Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Los diagramas de Venn se realizaron con la herramienta *VENNY 2.1* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

2.14. Repositorio de datos

Las tablas suplementarias mencionadas a lo largo de esta tesis están disponibles en el enlace <https://goo.gl/qRjVjr>.

3. RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Las proteínas LSM1 de Arabidopsis se acumulan diferencialmente en respuesta a distintos estreses abióticos

En nuestro laboratorio habíamos demostrado que los genes *LSM1A* y *LSM1B*, así como las correspondientes proteínas, se acumulaban en respuesta a las temperaturas bajas (Perea-Resa, 2016). Con el fin de determinar si este también era el caso en respuesta a sequía y estrés salino, se analizó el patrón de expresión de *LSM1A* y *LSM1B* en plantas silvestres de *Arabidopsis* expuestas diferentes periodos de tiempo a estrés hídrico (55% PEG) o salino (150 mM NaCl) mediante experimentos de qPCR. Los resultados obtenidos revelaron que los niveles de transcritos *LSM1A* y *LSM1B* no variaban en respuesta a estos estreses (Fig. 1A, B). Los niveles de proteínas LSM1A y LSM1B en respuesta a sequía y estrés salino se determinaron mediante experimentos de tipo *Western-blot* a partir de plantas *c-lsm1a* y *c-lsm1b* expuestas durante diferentes tiempos a 55% PEG y 150 mM NaCl. De manera similar a sus correspondientes mRNAs, los niveles de las proteínas LSM1A:GFP y LSM1B:GFP no variaban en ninguno de los casos (Fig. 1C, D). A diferencia de lo descrito en respuesta a temperaturas bajas, ni la expresión de los genes *LSM1*, ni los niveles de proteínas LSM1 se ven alterados en respuesta a sequía ni a estrés salino.

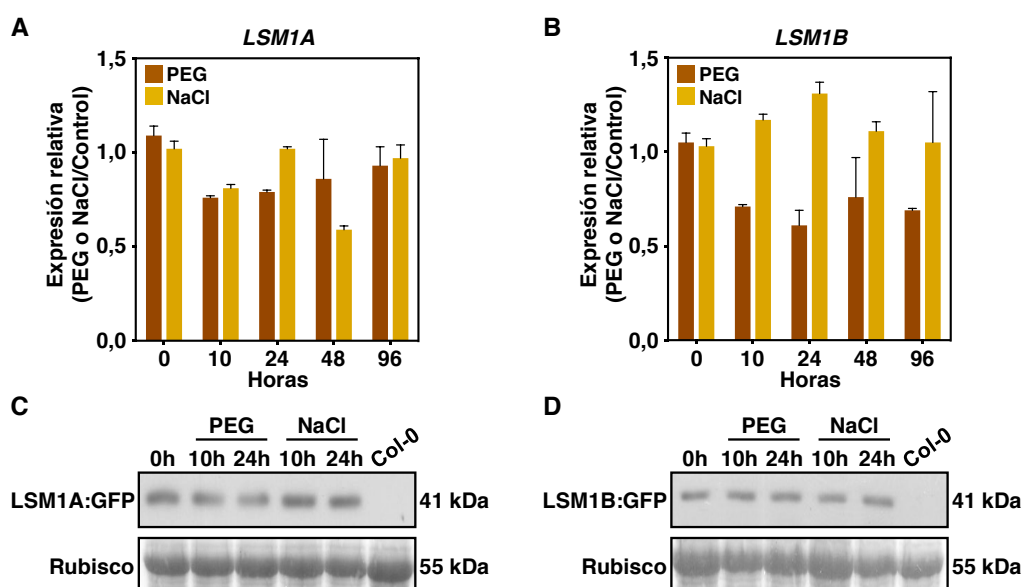


Figura 1. La acumulación de mRNAs y proteínas LSM1 de *Arabidopsis* no varía en respuesta a sequía ni a estrés salino. Análisis de la expresión de *LSM1A* (A) y *LSM1B* (B) en plantas silvestres de dos semanas de edad expuestas diferentes tiempos a estrés hídrico (55% PEG; barras marrones) o estrés salino (150 mM NaCl; barras amarillas). Los niveles de expresión, determinados mediante qPCR, están relativizados a sus correspondientes valores a tiempo 0. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. (C y D) Determinación, mediante ensayos de tipo *Western-blot*, de los niveles de proteínas LSM1A:GFP (C) y LSM1B:GFP (D) en plantas *c-lsm1a* y *c-lsm1b*, respectivamente, de dos semanas de edad expuestas diferentes tiempos a 55% PEG o 150 mM NaCl. Un carril con extractos de proteínas totales obtenidas de plantas silvestres (Col-0) se incluyó como control negativo. Los niveles de la subunidad grande de la proteína Rubisco (55 kDa), obtenidos mediante la tinción de la membrana con Azul de Coomassie, sirvieron como control de carga.

3.2. Las proteínas LSM1 de Arabidopsis se localizan en *P-bodies* y son esenciales para el ensamblaje de estos corpúsculos citoplásmicos en respuesta a estrés abiótico

La exposición de las plantas a temperaturas bajas, aparte de incrementar los niveles de proteínas LSM1, promueve su relocalización en *P-bodies*. Además, en esas condiciones ambientales, el ensamblaje de estos corpúsculos citoplásmicos depende de las proteínas LSM1 (Perea-Resa, 2016). Así pues, nos planteamos si, a pesar de no observar cambios en los niveles de proteínas LSM1, la exposición a sequía o estrés salino inducía su relocalización a *P-bodies*. Con el fin de responder a esta pregunta, analizamos la distribución subcelular de las proteínas LSM1:GFP en células de raíces de plántulas *c-lsm1a* y *c-lsm1b* mediante microscopía confocal. En condiciones control, las proteínas LSM1A:GFP y LSM1B:GFP se encontraban uniformemente distribuidas en el citoplasma (Fig. 2A, B). Sin embargo, cuando las plantas fueron tratadas con 55% PEG o 150 mM NaCl, ambas proteínas se agregaron en puntos discretos del citoplasma semejantes a *P-bodies* (Fig. 2A, B). Para confirmar que esos puntos discretos correspondían a *P-bodies*, se realizaron dos experimentos complementarios. En primer lugar, las plántulas expuestas a sequía o estrés salino se trataron con cicloheximida, un compuesto que provoca la disgregación de *P-bodies* (Sheth, 2003). Los resultados mostraron que la cicloheximida inhibía la agregación de LSM1A y LSM1B en los corpúsculos citoplásmicos en ambas condiciones (Fig. 2A, B). En segundo lugar, se estudió si LSM1A y LSM1B colocalizaban con el marcador de *P-bodies* DCP1 (Xu, 2006). El análisis de plantas *c-lsm1a* y *c-lsm1b* que expresaban la proteína RFP:DCP1 bajo el control del promotor 35S demostró que tanto LSM1A:GFP como LSM1B:GFP colocalizaban con RFP:DCP1 en respuesta a 55% PEG o 150 mM NaCl (Fig. 2C, D), confirmando que las proteínas LSM1A y LSM1B se localizan en *P-bodies* en condiciones de estrés hídrico o salino.

Finalmente, estudiamos si las proteínas LSM1 de Arabidopsis también se requerían para la formación de *P-bodies* en condiciones de sequía y estrés salino. Para ello, se determinó la localización subcelular de las proteínas DCP2 y VCS (Sheth, 2003; Xu, 2006), que forman parte del complejo de *decapping* y se acumulan también en *P-bodies*, en los mutantes *lsm1a lsm1b*. El análisis de células de raíz de plantas silvestres de Arabidopsis expresando las fusiones traduccionales 35S:GFP:DCP2 o 35S:GFP:VCS mediante microscopía confocal, reveló que las proteínas GFP:DCP2 y GFP:VCS se localizaban en *P-bodies* en presencia de sequía y alta salinidad (Fig. 2E, F). Por el contrario, en plantas mutantes *lsm1a lsm1b* estas proteínas presentaban una localización citoplásmica dispersa, indicando la ausencia de *P-bodies* (Fig. 2E, F). Todos estos resultados demostraron que las proteínas LSM1A y LSM1B no solo se acumulan en *P-bodies* en respuesta a sequía o estrés salino, sino que también son

esenciales para el ensamblaje de estos corpúsculos citoplásmicos bajo estas condiciones de estrés.

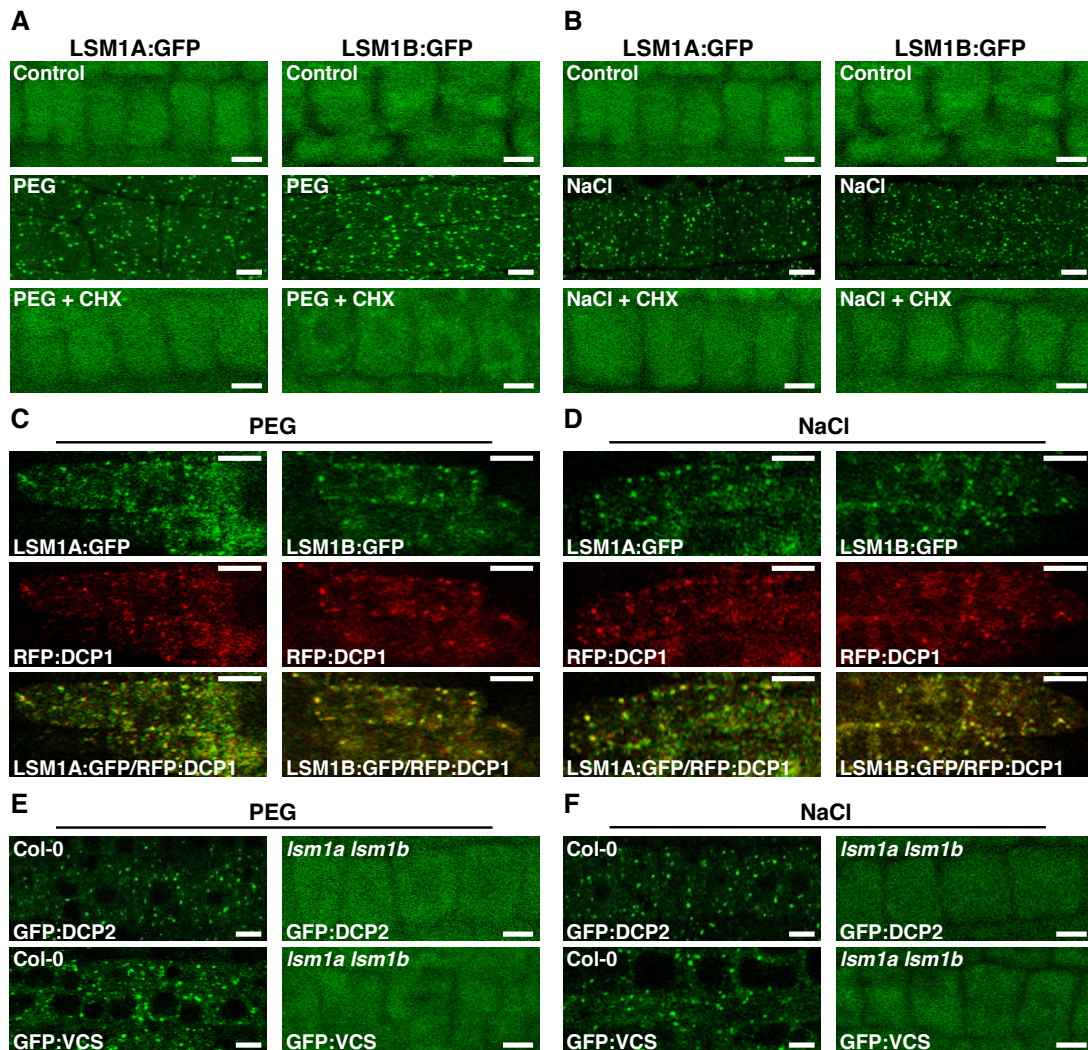


Figura 2. Las proteínas LSM1 de Arabidopsis se localizan en *F-bodies* y son esenciales para su ensamblaje en respuesta a la sequía y al estrés salino. Localización subcelular de LSM1A:GFP y LSM1B:GFP en células de raíces de plántulas *c-lsm1a* y *c-lsm1b* de siete días de edad, respectivamente, que habían crecido en medio GM (control) o que fueron expuestas 10 horas adicionales a 55% PEG (A) o 150 mM NaCl (B) en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX). Colocalización de LSM1A:GFP y LSM1B:GFP con RFP:DCP1 en células de raíces de plántulas de siete días de edad expuestas 10 horas adicionales a 55% PEG (C) o 150 mM NaCl (D). Localización subcelular de GFP:DCP2 y GFP:VCS en células de raíces de plántulas silvestres (Col-0) y *lsm1a lsm1b* de siete días de edad expuestas durante 10 horas a 55% PEG (E) o 150 mM NaCl (F). En todos los casos las barras representan 20 μ m.

3.3. El complejo LSM1-7 regula diferencialmente la tolerancia de Arabidopsis a distintos tipos de estrés abiótico

Dado el papel del complejo LSM1-7 en el control del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Perea-Resa, 2016), nos preguntamos si también podría participar en la regulación de la tolerancia de Arabidopsis a la sequía y al estrés salino, dos estreses muy relacionados con las temperaturas bajas (Mahajan, 2005). Para contestar a esta pregunta, en primer lugar, se caracterizó la tolerancia de plántulas *lsm1a lsm1b* a estas condiciones

adversas. La tolerancia a la sequía se evaluó mediante dos aproximaciones experimentales. Por un lado, plántulas que habían crecido durante siete días en placas con medio GM se transfirieron a placas de GM infusionadas con 0% o 25% PEG, que produce un déficit hídrico moderado (Verslues, 2006). Después de una semana, las plantas mutantes mostraron mayor peso fresco y número de raíces laterales que las plántulas silvestres (Fig. 3A, B). Además, también se evaluó la tolerancia a la sequía en plantas crecidas en tierra. Para ello, plantas de dos semanas de edad que habían crecido en condiciones control fueron

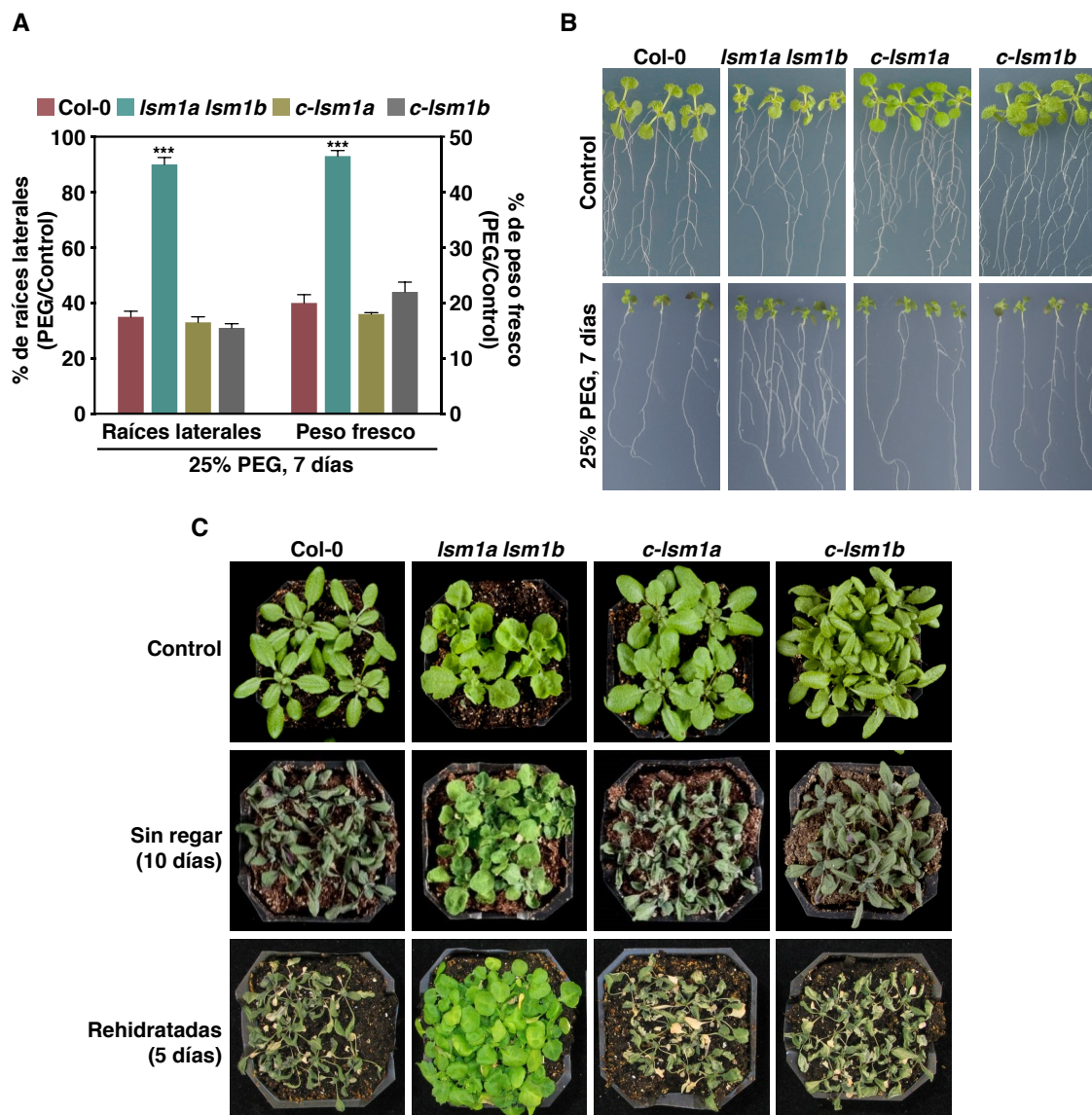


Figura 3. El complejo LSM1-7 regula negativamente la tolerancia de *Arabidopsis* a la sequía. (A) Cuantificación de la tolerancia al estrés hídrico de plántulas silvestres (Col-0), *lsm1a lsm1b*, *c-lsm1a* y *c-lsm1b* de siete días de edad tras ser expuestas a 0% (Control) o 25% PEG durante siete días adicionales. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (***) entre el mutante *lsm1a lsm1b* y las plantas Col-0 calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). (B y C) Imágenes representativas de plántulas crecidas en medio GM (control) o expuestas siete días adicionales a 25% PEG (B), y de plantas de dos semanas de edad crecidas en tierra en condiciones control a las que se les retiró el riego durante 10 días, tras lo cual se volvieron a regar durante cinco días adicionales (C).

dejadas de regar durante 10 días, tras lo cual fueron rehidratadas durante cinco días. Mientras que las plantas silvestres no sobrevivieron al tratamiento, los mutantes *lsm1a lsm1b* no se vieron afectados (Fig. 3C). En todos los casos, las plantas *lsm1a lsm1b* complementadas con la versión silvestre, tanto de *LSM1A* como de *LSM1B*, fusionada con el gen de la proteína GFP (*c-lsm1a* y *c-lsm1b*), mostraron niveles de tolerancia similares a las plantas silvestres, estableciendo que los fenotipos de las plantas *lsm1a lsm1b* eran una consecuencia directa de la ausencia de LSM1 (Fig. 3A, B, C). En conjunto, estos resultados demostraron que la proteína LSM1, y por tanto el complejo LSM1-7, regula negativamente la tolerancia a la sequía en Arabidopsis.

La tolerancia a estrés salino de plántulas *lsm1a lsm1b* se analizó tras siete días de crecimiento en placas con medio GM, y su posterior transferencia a placas suplementadas con distintas concentraciones de NaCl (0 y 150 mM). Después de una semana, las plántulas *lsm1a lsm1b* expuestas a 150 mM NaCl presentaron menor peso fresco y raíces principales más cortas que las plántulas silvestres, indicando que eran más sensibles al estrés salino que estas últimas (Fig. 4A, B). Para corroborar este fenotipo, se evaluó también la tolerancia a altas concentraciones de sal de plantas silvestres y *lsm1a lsm1b* de dos semanas de edad que habían sido crecidas en tierra y regadas con una solución de 250 mM NaCl durante 10 días. Mientras que las plantas silvestres no presentaban daños apreciables, las plantas mutantes sufrían una pérdida de clorofila generalizada y la muerte de numerosas hojas de la roseta, evidenciando, una vez más, una mayor sensibilidad a este tratamiento (Fig. 4C). En ambas aproximaciones experimentales, las plantas *c-lsm1a* y *c-lsm1b* exhibieron los mismos fenotipos de tolerancia que las plantas silvestres, demostrando que los fenotipos de las plantas *lsm1a lsm1b* expuestas a alta salinidad eran debidos a la ausencia de LSM1 (Fig. 4A, B, C). Estos resultados permitieron concluir que LSM1, y por tanto el complejo citoplásmico LSM, regula positivamente la tolerancia al estrés salino en Arabidopsis, lo que, junto con los datos anteriormente descritos en nuestro laboratorio, supone la primera evidencia genética de que este complejo regula diferencialmente la tolerancia de Arabidopsis a distintos estreses abióticos. Por un lado, regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas y la tolerancia a sequía, y, por otro, funciona como un regulador positivo de la tolerancia al estrés salino.

3.4. El complejo LSM1-7 de Arabidopsis regula diferencialmente la expresión génica en respuesta a distintos estreses abióticos

El complejo LSM1-7 controla el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas a través de la regulación de la expresión génica, promoviendo el *decapping* y la consecuente

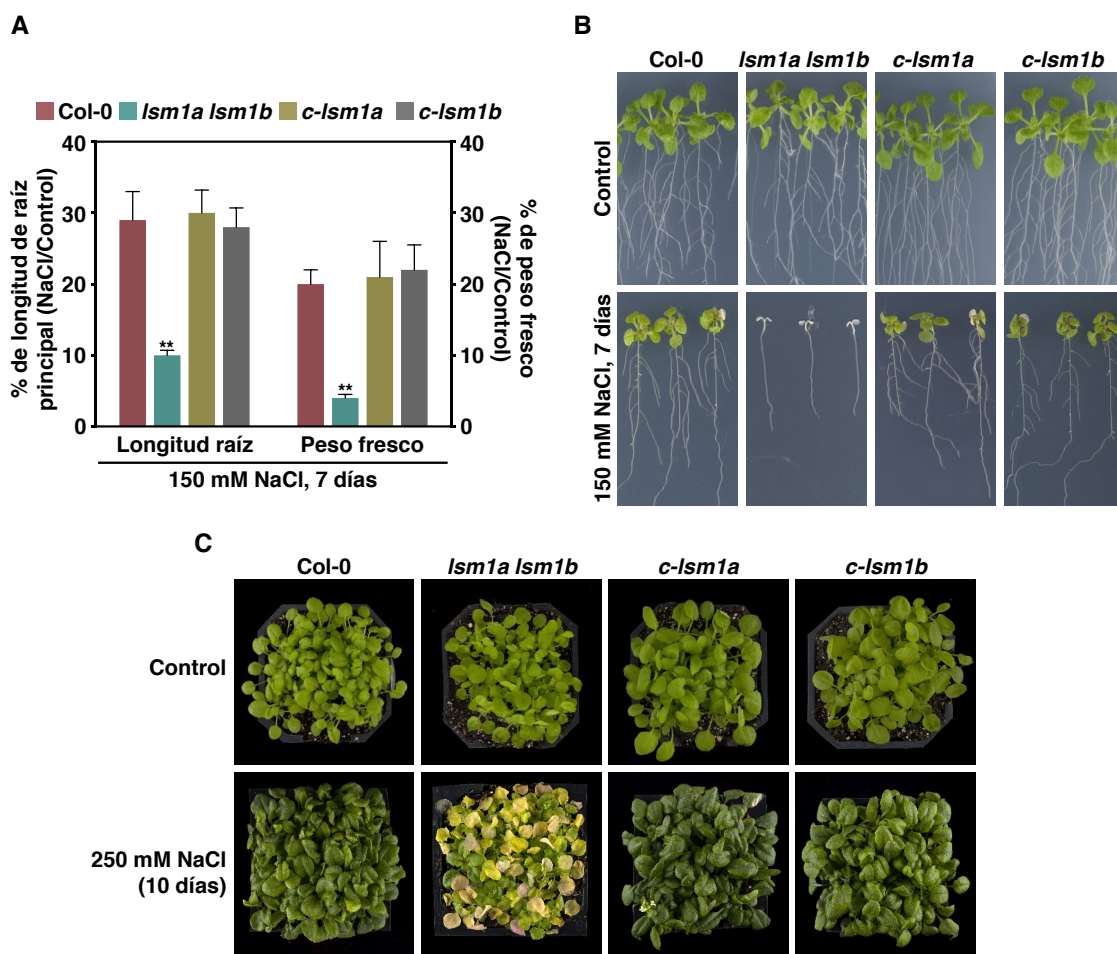


Figura 4. El complejo LSM1-7 regula positivamente la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino. (A) Cuantificación de la tolerancia al estrés salino de plántulas silvestres (Col-0), *lsm1a lsm1b*, *c-lsm1a* y *c-lsm1b* de siete días de edad tras ser expuestas a 0 mM (Control) o 150 mM NaCl durante siete días adicionales. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (**P≤0,001) entre el mutante *lsm1a lsm1b* y las plantas Col-0 calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). (B y C) Imágenes representativas de plántulas crecidas en medio GM (control) o expuestas siete días adicionales a 150 mM NaCl (B), y de plantas de dos semanas de edad crecidas en tierra en condiciones control, que fueron regadas posteriormente cada dos días con 250 mM NaCl durante 10 días (C).

degradación de mensajeros que codifican importantes reguladores de este proceso (Perea-Resa, 2016). Con el fin de determinar si el complejo LSM1-7 tiene una función similar en la tolerancia de *Arabidopsis* a la sequía y al estrés salino, se realizó un análisis transcriptómico (RNA-seq) de plantas silvestres y mutantes *lsm1a lsm1b* expuestas a estas condiciones adversas. En cada tratamiento, se consideraron como genes con expresión desregulada en el mutante *lsm1a lsm1b* aquellos que mostraban una expresión dos veces mayor o menor y un valor de FDR ≤ 0,001 respecto a las plantas silvestres. En respuesta a sequía (55% PEG, 10h), 895 y 554 genes mostraban mayor y menor expresión en las plantas *lsm1a lsm1b* que en las plantas silvestres, respectivamente (Tabla suplementaria 2). Es de destacar que el 37,8% de los genes altos en las plantas *lsm1a lsm1b* habían sido descritos previamente como inducibles por este estrés (Kilian, 2007) y algunos de ellos, como *ABR1*, *ANAC019* y

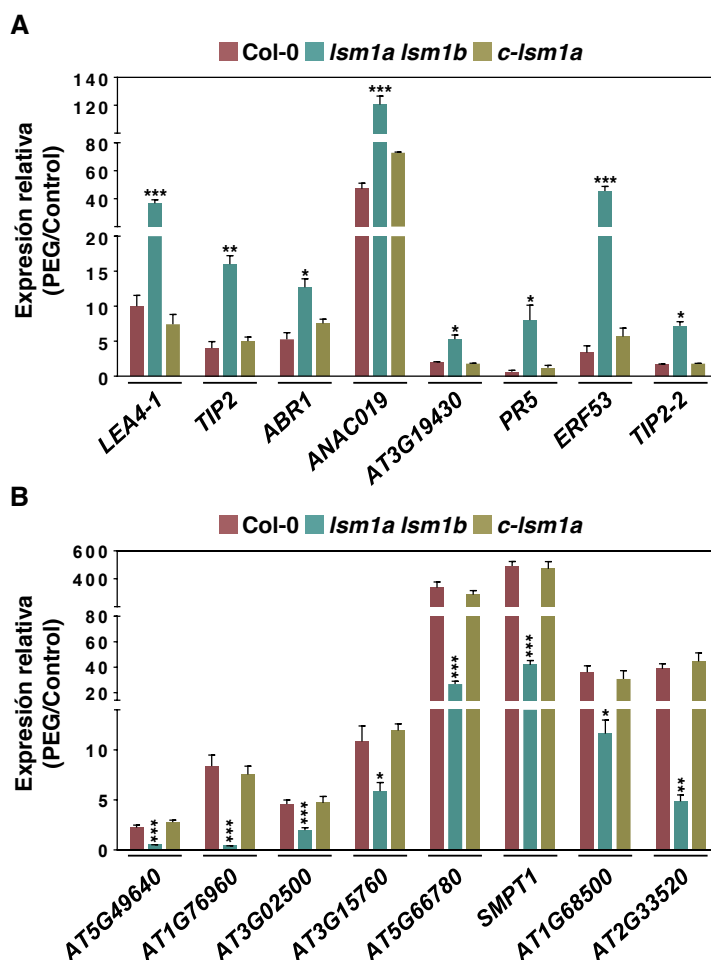


Figura 5. El complejo LSM1-7 de *Arabidopsis* regula la expresión génica en respuesta a la sequía. Expresión de genes inducibles en respuesta a sequía cuya expresión es mayor (A) o menor (B) en las plantas *lsm1a lsm1b* respecto a la de plantas silvestres (Col-0). Los niveles de expresión, determinados mediante qPCR, en plantas Col-0, *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* de dos semanas de edad expuestas durante 10 horas a 55% PEG están relativizados a sus correspondientes valores en plantas que habían crecido en medio GM (Control). En ambos gráficos, las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0001$) entre las plantas *lsm1a lsm1b* y las plantas Col-0 o *c-lsm1a* calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA).

ERF53, además, como reguladores positivos de la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés hídrico (Tran, 2004; Pandey, 2005; Cheng, 2012). El aumento en la expresión de estos genes, por lo tanto, podría ser responsable de la mayor tolerancia del mutante *lsm1a lsm1b* a este estrés. Por otro lado, el 35,7% de los genes bajos en las plantas *lsm1a lsm1b* habían sido reportados como inducibles en respuesta a sequía (Kilian, 2007), sin embargo, ninguno de ellos ha sido identificado, todavía, como regulador negativo de la tolerancia de *Arabidopsis* a este estrés. Los resultados del análisis de RNA-seq se validaron analizando la expresión de varios de los genes con expresión desregulada en muestras independientes de RNA de plantas silvestres, *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* expuestas a 55% PEG mediante qPCR (Fig. 5A, B).

En respuesta a salinidad (150 mM NaCl, 10h), la expresión de 1165 y 918 genes era más alta y más baja, respectivamente, en las plantas *lsm1a lsm1b* que en las plantas silvestres (Tabla suplementaria 3). En este caso, el 47,2% de los genes con expresión alta habían sido descritos como inducibles en respuesta a altas concentraciones de NaCl (Kilian, 2007). Además, algunos de ellos, como *ANAC092*, *ATGSTU17* y *AHK5*, son reguladores

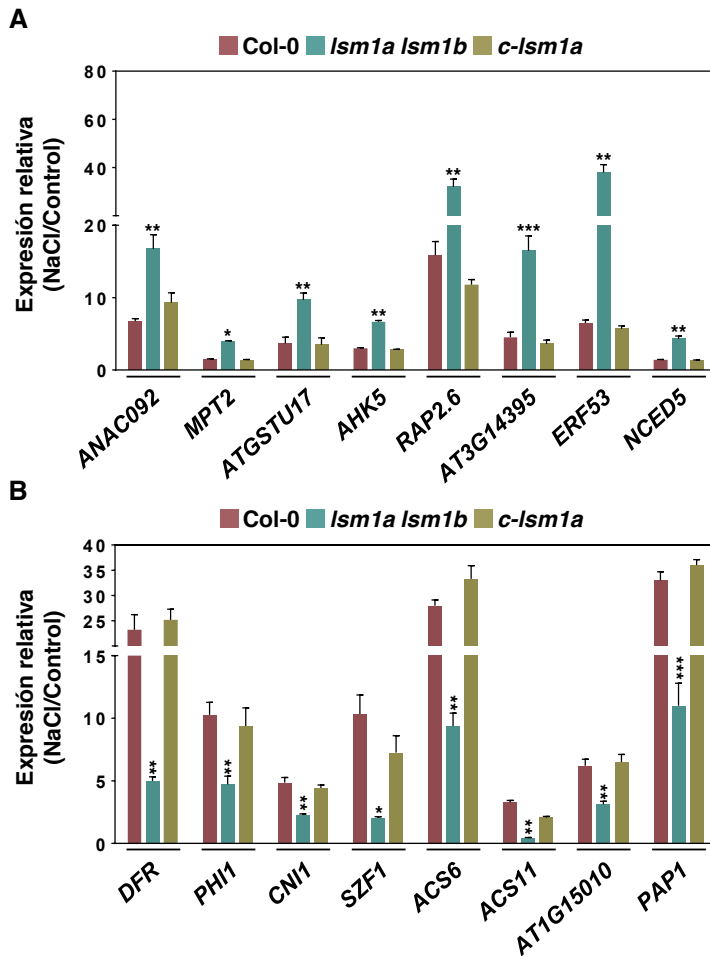


Figura 6. El complejo LSM1-7 de *Arabidopsis* regula la expresión génica en respuesta al estrés salino. Expresión de genes inducibles en respuesta a estrés salino cuya expresión es mayor (A) o menor (B) en las plantas *lsm1a lsm1b* respecto a la de plantas silvestres (Col-0). Los niveles de expresión, determinados mediante qPCR, en plantas Col-0, *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* de dos semanas de edad expuestas durante 10 horas a 150 mM NaCl están relativizados a sus correspondientes valores en plantas que habían crecido en medio GM (Control). En ambos gráficos, las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0001$) entre las plantas *lsm1a lsm1b* y las plantas Col-0 o *c-lsm1a* calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA).

negativos de la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino (Balazadeh, 2010; Chen, 2012; Pham, 2012). Por otro lado, el 46,1% de los genes con expresión más baja en las plantas *lsm1a lsm1b* habían sido reportados como inducibles en respuesta a NaCl (Kilian, 2007) y algunos de ellos, tales como *DFR*, *PHI1* y *CNI1*, además, como reguladores positivos de la tolerancia de *Arabidopsis* a salinidad (Cui, 2014a; Peng, 2014). La alteración de la expresión de reguladores tanto negativos como positivos originaría el fenotipo de sensibilidad al estrés salino exhibido por las plantas *lsm1a lsm1b*. Los resultados de RNA-seq se validaron analizando los niveles de expresión de genes inducidos y reprimidos en plantas silvestres, *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* mediante qPCR (Fig. 6A, B). En todos los casos, los genes validados mediante qPCR presentaron los mismos niveles de expresión en las plantas *c-lsm1a* que en las plantas silvestres, estableciendo que la expresión alterada en las plantas *lsm1a lsm1b* expuestas a sequía o estrés salino es debida a la ausencia del complejo LSM1-7.

Cuando se compararon los genes afectados en el mutante *lsm1a lsm1b* en condiciones de estrés hídrico con los afectados en respuesta a estrés salino, los resultados revelaron que 402 (44,9%) y 672 (57,7%) de los genes inducidos en el mutante en 55% PEG y 150 mM NaCl, respectivamente, son regulados por el complejo LSM1-7 de manera específica (Fig. 7A).

Asimismo, 326 (58,8%) de los genes reprimidos en sequía y 690 (75,2%) en estrés salino, también son regulados específicamente por el complejo (Fig. 7B). Únicamente 493 y 228 genes inducidos y reprimidos en el mutante *lsm1a lsm1b*, respectivamente, son regulados en ambas condiciones de estrés abiótico por el complejo citoplásmico LSM (Fig. 7A, B). En su conjunto, los resultados expuestos anteriormente indican que el complejo citoplásmico LSM1-7 regula la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés hídrico y salino controlando, diferencialmente, los niveles de expresión de numerosos genes implicados en la respuesta de las plantas a condiciones ambientales adversas.

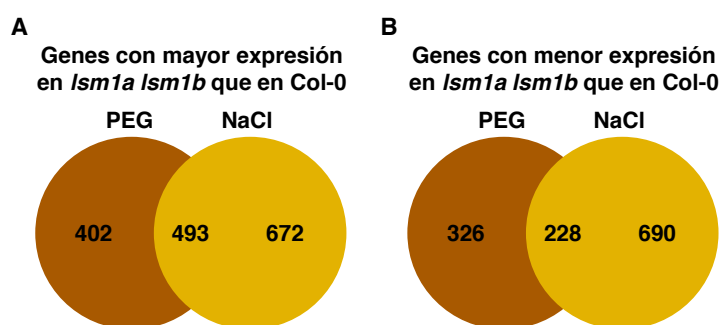


Figura 7. El complejo LSM1-7 de *Arabidopsis* regula la expresión génica de manera diferencial en respuesta a diferentes estreses abióticos. Diagramas de Venn que muestran el solapamiento entre los genes cuya expresión es mayor (A) o menor (B) en las plantas *lsm1a lsm1b* que en las plantas silvestres (Col-0) en condiciones de estrés hídrico (55% PEG) o salino (150 mM NaCl). En cada caso se indica el número de genes específicos y comunes.

3.5. El complejo LSM1-7 regula la degradación de diferentes transcritos implicados en la tolerancia de *Arabidopsis* a estrés abiótico, dependiendo de las condiciones de estrés

Como ya se ha mencionado en la Introducción, el complejo LSM1-7 promueve el *decapping* y la consiguiente degradación de sus mensajeros diana mediante la interacción de estos con LSM1 (Chowdhury, 2007). Es razonable pensar, por tanto, que este complejo podría regular diferencialmente la expresión génica en respuesta a estreses abióticos interaccionando con mensajeros específicos, dependiendo de las condiciones de estrés. Para estudiar esta posibilidad, se identificaron mRNAs que interaccionan con LSM1 en respuesta a sequía y estrés salino mediante ensayos de inmunoprecipitación de RNA (RIP). Estos ensayos se llevaron a cabo con plantas *c-lsm1a* crecidas en condiciones control o expuestas a estrés hídrico (55% PEG, 10h) o salino (150 mM NaCl, 10h). Como control de la especificidad de las interacciones detectadas con LSM1, también se llevaron a cabo experimentos de RIP con plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contenían la fusión *GRP7_{PRO}:GRP7:GFP*. Dada la función del complejo LSM1-7, era de esperar que sus mensajeros diana se encontrasen entre los mRNAs que mostraban niveles de expresión más altos en las plantas *lsm1a lsm1b* respecto a las plantas silvestres expuestas a estrés abiótico (Fig.5A y 6A). Entre los transcritos inducibles por sequía o estrés salino cuyos niveles habíamos confirmado por qPCR que eran mayores en las plantas *lsm1a lsm1b* que en las

silvestres, *ABR1*, *ANAC019* y *ERF53* se encontraron enriquecidos significativamente en los extractos de plantas *c-lsm1a* expuestas a estrés hídrico (Fig. 8A), y *ANAC092*, *AHK5*, *ERF53* y *NCED5* en los extractos de plantas *c-lsm1a* expuestas a NaCl (Fig. 8B). Algunos transcritos, como *ERF53* y *NCED5*, también se encontraron enriquecidos significativamente en extractos de plantas *c-lsm1a* no estresadas, aunque a niveles significativamente más bajos que en las situaciones de estrés (Fig. 8A, B), sugiriendo que también eran dianas del complejo LSM1-7 en condiciones control.

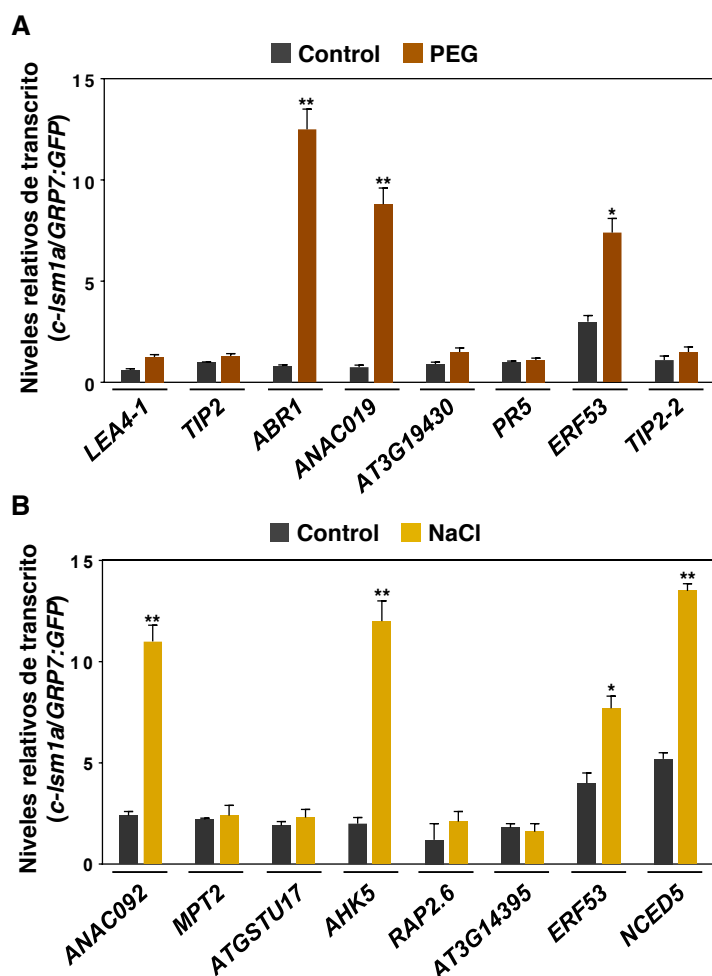


Figura 8. El complejo LSM1-7 de *Arabidopsis* interacciona con mensajeros inducibles por estrés hídrico y salino en respuesta a estas condiciones de estrés. Ensayos RIP con muestras de plantas *c-lsm1a* de dos semanas de edad que habían crecido en medio GM (Control) o que habían sido expuestas 10 horas adicionales a 55% PEG (A) o 150 mM NaCl (B) utilizando un anticuerpo anti:GFP. Para determinar la especificidad de la interacción de los mRNAs con la proteína LSM1A:GFP, se realizaron experimentos de RIP con muestras de plantas que contenían la fusión *GRP7_{PRO}:GRP7:GFP*. Los mRNAs inmunoprecipitados correspondientes a diferentes genes inducibles en respuesta a la sequía (A) o al estrés salino (B), cuyos niveles habíamos confirmado eran mayores en las plantas *lsm1a lsm1b* que en las plantas silvestres, se cuantificaron mediante qPCR. Los niveles de los mRNAs inmunoprecipitados en extractos de plantas *c-lsm1a* fueron corregidos respecto a sus correspondientes niveles en extractos antes de inmunoprecipitar y a los detectados en las plantas

GRP7_{PRO}:GRP7:GFP. En ambos gráficos las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (*P≤0,01; **P≤0,001) entre las muestras procedentes de plantas estresadas o crecidas en condiciones control calculadas mediante una prueba de t de Student.

Dado que el complejo LSM1-7 controla la degradación de sus mRNAs dianas promoviendo su *decapping* (Perea-Resa, 2012), para confirmar que los transcritos identificados mediante los ensayos de RIP eran realmente mensajeros diana del complejo, se cuantificaron sus niveles de estructuras 5' CAP mediante experimentos de tipo RACE acoplados a qPCR en plantas silvestres, *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* expuestas a estrés hídrico y salino (Fig. 9A, B). Estos experimentos revelaron que únicamente los mensajeros de *ABR1*, *ANAC019* y *ERF53*

presentaban mayores niveles de estructuras 5'CAP en los mutantes *lsm1a lsm1b* que en las plantas silvestres y *c-lsm1a* expuestas a 55% PEG (Fig. 9A). En el caso del estrés salino, solo los transcritos correspondientes a *ANAC092*, *AHK5*, *ERF53* y *NCED5* tenían mayores niveles de estructuras 5'CAP en las plantas *lsm1a lsm1b* que en las plantas silvestres y *c-lsm1a* (Fig. 9B). Además, los niveles de mRNAs *ERF53* y *NCED5* con estructuras 5'CAP eran también mayores en las plantas *lsm1a lsm1b* que en las de plantas silvestres y *c-lsm1a* en condiciones control (Fig. 9A, B). Así pues, en respuesta a estrés hídrico y salino, el complejo LSM1-7 interacciona con transcritos inducibles por estas condiciones adversas, promoviendo su *decapping*.

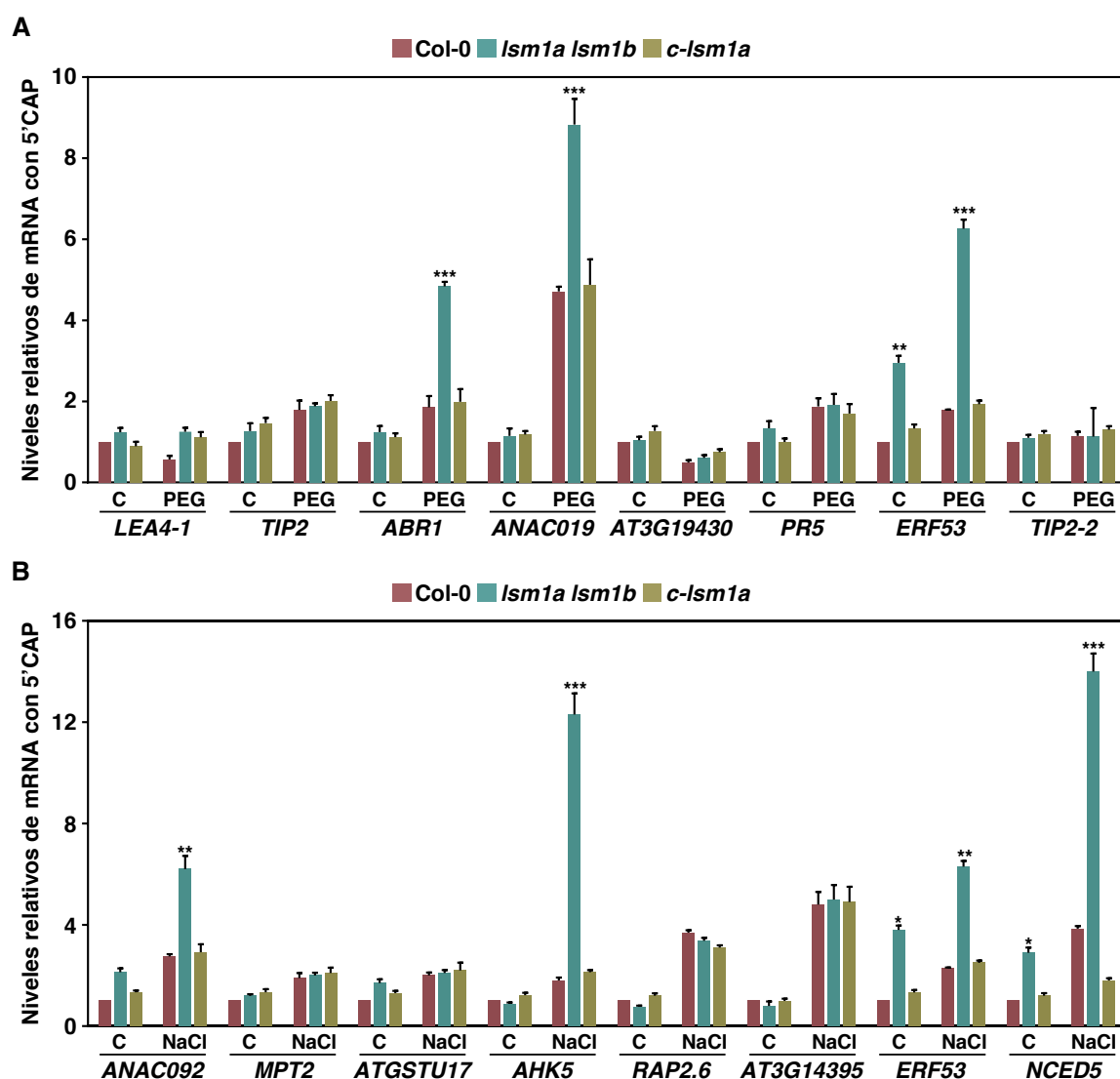


Figura 9. El complejo LSM1-7 de *Arabidopsis* promueve el *decapping* de sus transcritos diana en respuesta a sequía y a estrés salino. Cuantificación mediante qPCR de mRNAs con estructura 5'CAP en plantas silvestres (Col-0), *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* de dos semanas de edad que habían crecido en medio GM (C) o que habían sido expuestas 10 horas adicionales a 55% PEG (A) o 150 mM NaCl (B). En todos los casos, los niveles de mensajeros con estructuras 5'CAP fueron corregidos respecto a la expresión total de sus correspondientes transcritos, y se muestran relativos a los detectados en plantas Col-0 no estresadas. En ambos gráficos las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0001$) entre las plantas *lsm1a lsm1b* y las plantas Col-0 o *c-lsm1a* calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA).

Con el fin de establecer si el complejo LSM1-7 podría controlar la degradación de mRNAs específicos dependiendo de las condiciones ambientales a las que están expuestas las plantas, analizamos si los transcritos *ABR1* y *ANAC019* eran también dianas en respuesta a estrés salino y los transcritos *ANAC092*, *AHK5* y *NCED5* a estrés hídrico. Los análisis de RIP en plantas *c-lsm1a* tratadas con 55% PEG o 150 mM NaCl mostraron que los mRNAs de *ABR1* y *ANAC019* estaban enriquecidos únicamente en muestras de plantas sometidas a estrés hídrico (Fig. 10A). Por el contrario, los mensajeros de *ANAC092*, *AHK5* y *NCED5* se detectaron solamente en extractos de plantas expuestas a estrés salino (Fig. 10A). Como era de esperar, los mRNAs *ABR1* y *ANAC019* con estructura 5'CAP eran mayores en las plantas *lsm1a lsm1b* que en las plantas silvestres exclusivamente en condiciones de sequía (Fig. 10B), mientras que los transcritos *ANAC092*, *AHK5* y *NCED5* con 5'CAP eran mayores únicamente en los mutantes *lsm1a lsm1b* en condiciones de alta sal (Fig. 10B). En todos los casos, los niveles de mRNAs con 5'CAP fueron equivalentes entre las plantas silvestres y las *c-lsm1a* (Fig. 10B). Tomados en su conjunto, los resultados expuestos en este apartado indican que el complejo LSM1-7 regula la tolerancia de Arabidopsis al estrés hídrico y salino modulando diferencialmente la expresión génica en respuesta a estas condiciones de estrés, controlando, en cada caso, la degradación de un conjunto de mensajeros específicos y no específicos, implicados en dichas respuestas.

3.6. El complejo LSM1-7 de Arabidopsis regula diferencialmente la biosíntesis de ABA en respuesta a diferentes estreses abióticos

Cabe destacar que entre los mRNAs que son dianas del complejo LSM1-7 en respuesta al estrés salino se encuentra *NCED5*, que codifica una enzima clave en la biosíntesis de ABA, una hormona con un papel fundamental en la respuesta de las plantas al estrés abiótico (Tuteja, 2007). Los transcritos de *NCED5*, sin embargo, no son dianas del complejo LSM1-7 en respuesta a sequía, sugiriendo que el complejo LSM1-7 de Arabidopsis podría regular diferencialmente la biosíntesis de ABA en respuesta a diferentes estreses abióticos. Para validar esta hipótesis, se cuantificó la concentración de ABA en plantas silvestres y mutantes *lsm1a lsm1b* crecidas en condiciones control y expuestas a estrés hídrico o salino. Como se ha descrito (Jia, 2002; Wu, 2009), la exposición a ambos estreses provocó un aumento muy importante de ABA en las plantas silvestres (Fig. 11). Al determinar los niveles de ABA en las plantas *lsm1a lsm1b* expuestas a sequía, se pudo comprobar que no había diferencias significativas con la acumulación de ABA observada en las plantas silvestres. Por el contrario, en condiciones de alta sal el incremento en los niveles de ABA era significativamente mayor en los mutantes *lsm1a lsm1b* que en las plantas silvestres. Los

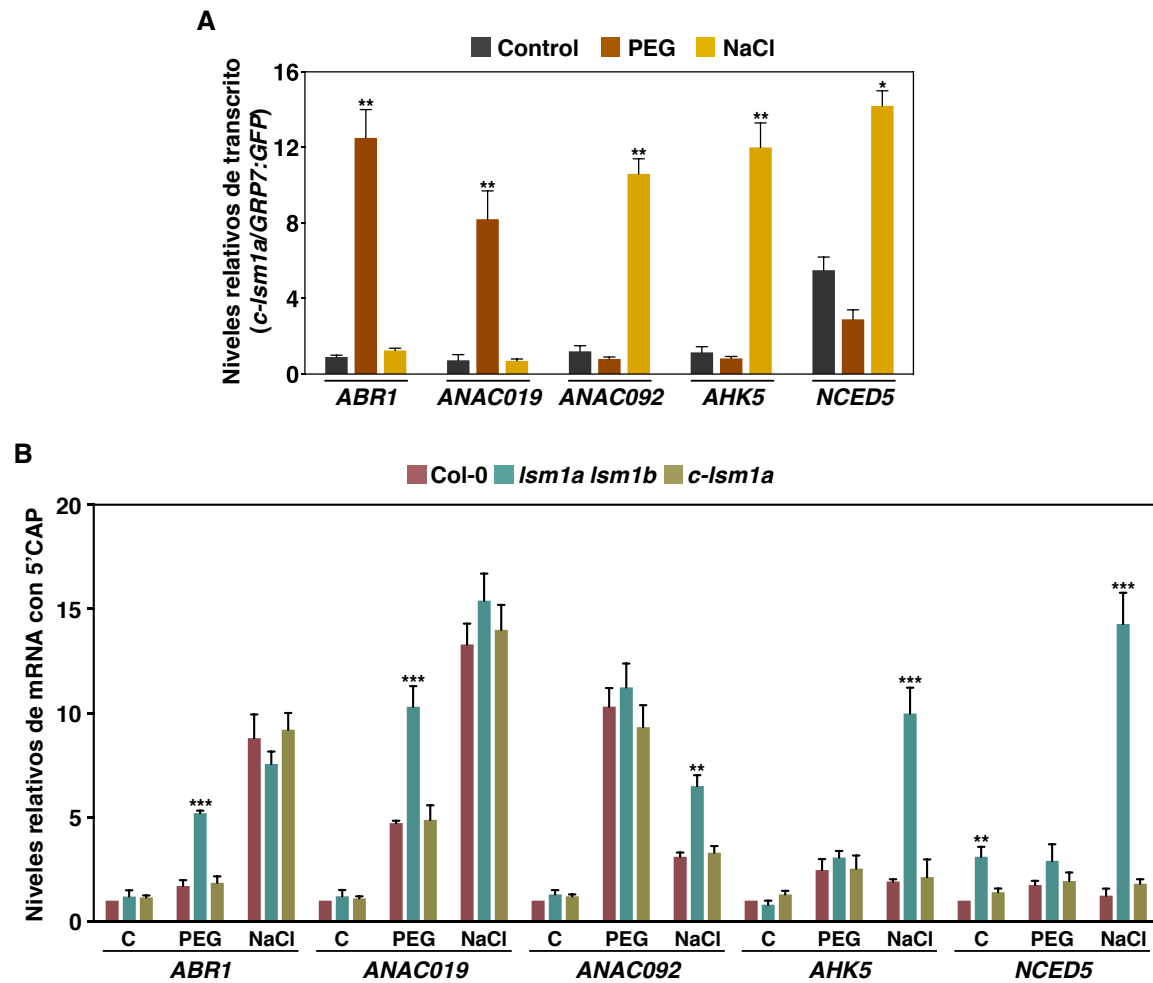


Figura 10. La interacción del complejo LSM1-7 de *Arabidopsis* con algunos de sus transcritos diana es dependiente de las condiciones ambientales. (A) Ensayos RIP de plantas *c-lsm1a* de dos semanas de edad que habían crecido en medio GM (Control) o que habían sido expuestas 10 horas adicionales a 55% PEG o 150 mM NaCl utilizando un anticuerpo anti-GFP. Para determinar la especificidad de la interacción de los mRNAs con la proteína LSM1A:GFP, se realizaron experimentos de RIP con muestras de plantas que contenían la fusión *GRP7_{PRO}:GRP7:GFP*. Los mRNAs inmunoprecipitados de los genes *ABR1*, *ANAC019*, *ANAC092*, *AHK5* y *NCED5* se cuantificaron mediante qPCR. Los niveles de los mRNAs inmunoprecipitados en los extractos de plantas *c-lsm1a* fueron corregidos respecto a sus correspondientes niveles en extractos antes de inmunoprecipitar y a los detectados en las plantas *GRP7_{PRO}:GRP7:GFP*. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$) entre las muestras procedentes de plantas estresadas o crecidas en condiciones control calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). (B) Cuantificación mediante qPCR de mRNAs con estructura 5'CAP en plantas silvestres (Col-0), *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* de dos semanas de edad que habían crecido en medio GM (C) o que habían sido expuestas 10 horas adicionales a 55% PEG o 150 mM NaCl. En todos los casos, los niveles de mensajeros con estructuras 5'CAP de los genes *ABR1*, *ANAC019*, *ANAC092*, *AHK5* y *NCED5* fueron corregidos respecto a la expresión total de sus correspondientes transcritos, y se muestran relativos a los detectados en plantas Col-0 no estresadas. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0001$) entre las plantas *lsm1a lsm1b* y las plantas Col-0 o *c-lsm1a* calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA).

mutantes *lsm1a lsm1b* también mostraron niveles más altos de ABA que las plantas silvestres en condiciones control, aunque significativamente más bajos que los detectados en respuesta a estrés salino (Fig. 11), en consonancia con la menor afinidad del complejo LSM1-7 por el mRNA de *NCED5* en condiciones control que de salinidad (Fig. 10A). En todos los casos, las plantas *c-lsm1a* exhibieron un contenido de ABA similar al de las plantas silvestres. En suma, nuestros datos demuestran que el complejo LSM1-7 de *Arabidopsis* modula diferencialmente la biosíntesis de ABA promoviendo la degradación del transcrito *NCED5*, en función de las condiciones ambientales.

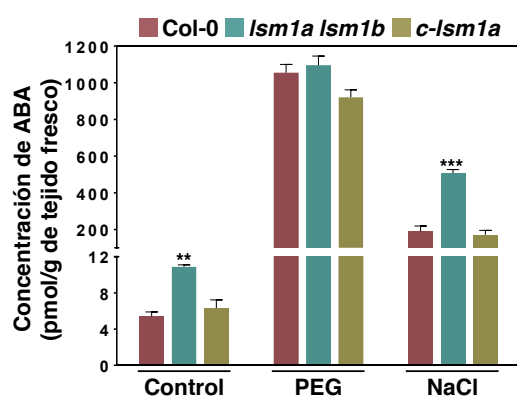


Figura 11. El complejo LSM1-7 de *Arabidopsis* regula diferencialmente la biosíntesis de ABA en respuesta a sequía y a estrés salino. Niveles de ABA en plantas silvestres (Col-0), *lsm1a lsm1b* y *c-lsm1a* de dos semanas de edad que habían crecido en medio GM (Control) o que habían sido expuestas 10 horas adicionales a 55% PEG o 150 mM NaCl. Las barras representan las medias (n=4) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0001$) entre las plantas *lsm1a lsm1b* y las plantas Col-0 o *c-lsm1a* calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA).

3.7. La proteína LSM8 y el U6 snRNA se acumulan diferencialmente en respuesta a distintos estreses abióticos en *Arabidopsis*

Para determinar si el complejo LSM2-8 podía estar regulado en respuesta al estrés hídrico y salino, se analizaron los niveles de transcritos *LSM8* en plantas de *Arabidopsis* expuestas a 55% PEG o 150 mM NaCl mediante experimentos de qPCR. A diferencia de lo que ocurre en respuesta a las temperaturas bajas, los mensajeros *LSM8* no se acumulaban en plantas sometidas a sequía o condiciones de alta sal (Fig. 12A). Consecuentemente, tampoco se detectó ningún incremento en los niveles de la proteína LSM8 en respuesta a estos estreses. Así, experimentos de tipo *Western-blot* utilizando muestras procedentes de plantas *c-lsm8* expuestas a 55% PEG o 150 mM NaCl mostraron que los niveles de LSM8:GFP son idénticos a los de las plantas crecidas en condiciones control (Fig. 12B). Como se ha mencionado anteriormente, resultados de nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que los niveles de expresión de *LSM8* aumentan en respuesta a temperaturas bajas (Hernández-Verdeja, 2015). No se ha determinado, sin embargo, si este incremento tenía consecuencias en la acumulación de LSM8 en respuesta a 4°C. Experimentos de *Western-blot* demostraron que los niveles de esta proteína aumentan progresivamente a partir de las 48 horas de exposición a 4°C (Fig. 12B). Por último, se analizó la distribución subcelular de LSM8:GFP

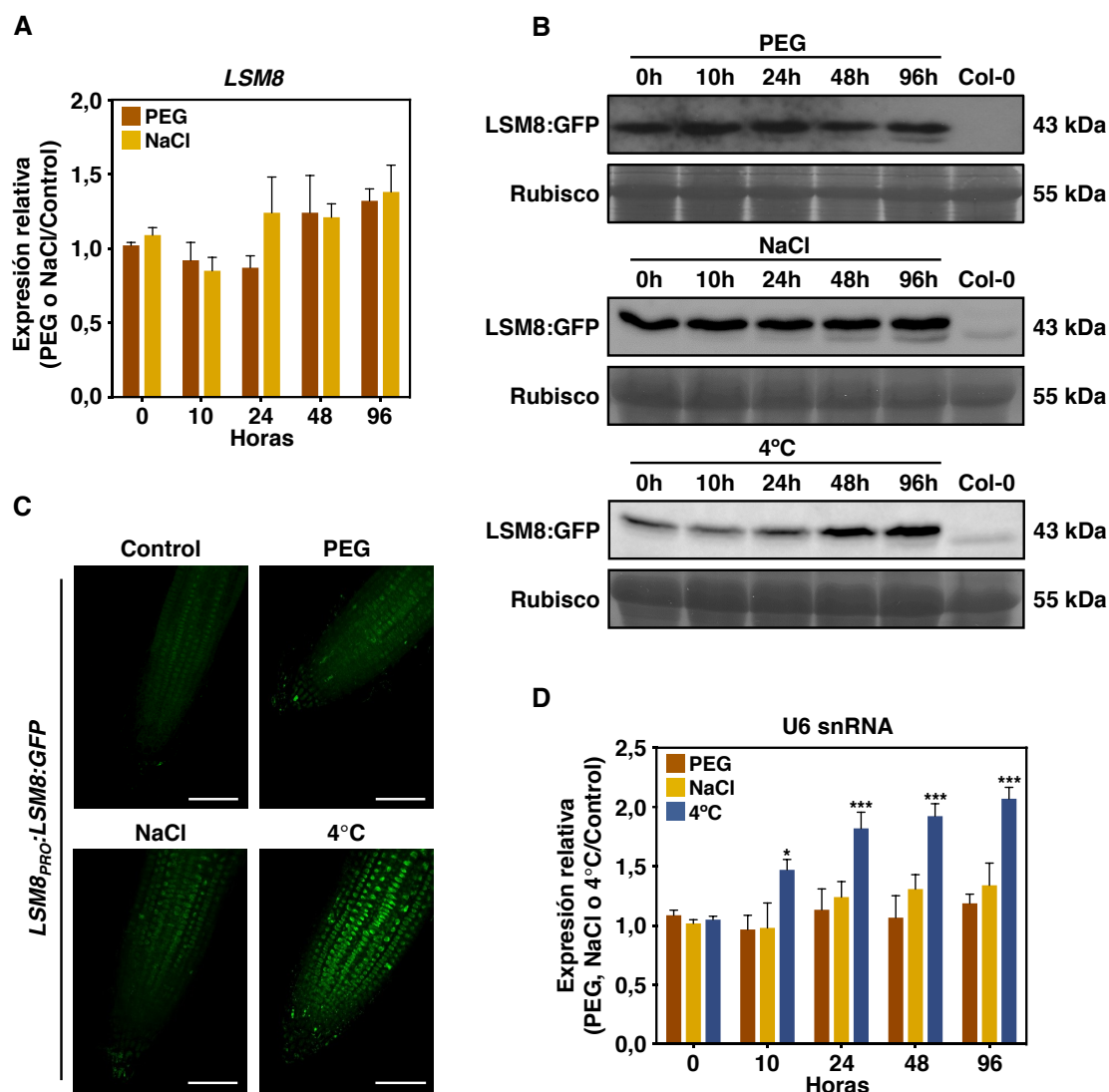


Figura 12. La proteína LSM8 y el U6 snRNA de *Arabidopsis* se acumulan diferencialmente en respuesta a estrés abiótico. (A) Análisis de la expresión de *LSM8* en plantas silvestres de dos semanas de edad expuestas diferentes tiempos a estrés hídrico (55% PEG; barras marrones) o estrés salino (150 mM NaCl; barras amarillas). Los niveles de expresión, determinados mediante qPCR, están relativizados a sus correspondientes valores a tiempo 0. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. (B) Determinación, mediante ensayos de tipo *Western-blot*, de los niveles de proteína LSM8:GFP en plantas *c-lsm8* de dos semanas de edad expuestas diferentes tiempos a 55% PEG, 150 mM NaCl o 4°C. Un carril con extractos de proteínas totales obtenidas de plantas silvestres (Col-0) se incluyó como control negativo. Los niveles de la subunidad grande de la proteína Rubisco (55 kDa), obtenidos mediante la tinción de la membrana con Azul de *Coomassie*, sirvieron como control de carga. (C) Localización subcelular de LSM8:GFP en células de raíces de plántulas *c-lsm8* de siete días de edad que habían crecido en medio GM (control) o que fueron expuestas 10 horas adicionales a 55% PEG, 150 mM NaCl o 48 horas adicionales a 4°C. Las barras representan 75 μ m. (D) Análisis de la expresión de U6 snRNA en plantas Col-0 de dos semanas de edad expuestas diferentes tiempos a 55% PEG (barras marrones), 150 mM NaCl (barras amarillas) o 4°C (barras azules). Los niveles de expresión, determinados mediante qPCR, están relativizados a sus correspondientes valores a tiempo 0. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,0001$) entre las plantas expuestas a 55% PEG, 150 mM NaCl o 4°C y las plantas no estresadas calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA).

en respuesta a sequía, salinidad o temperaturas bajas mediante microscopía confocal. Como era previsible, los niveles de LSM8:GFP aumentaban en los núcleos de células de raíces de plántulas *c-lsm8* expuestas durante 48 horas a 4°C (Fig. 12C), pero no se detectó ningún cambio significativo en su localización. En condiciones de estrés hídrico o salino no se observaron diferencias significativas ni en la acumulación ni en la localización subcelular de LSM8:GFP (Fig. 12C). El complejo nuclear LSM de Arabidopsis es esencial para la estabilización y el mantenimiento de los niveles adecuados del U6 snRNA (Perea-Resa, 2012). Cabe esperar, por tanto, que las variaciones en la acumulación de este complejo en respuesta a estrés abiótico, se vean reflejadas en los niveles del U6 snRNA. La figura 12D muestra que, en efecto, la exposición de las plantas a 4°C provocaba un incremento significativo del U6 snRNA. Por el contrario, el U6 snRNA no aumentaba en respuesta a sequía o altas concentraciones de sal. En suma, estos datos demostraban que el complejo LSM2-8 y, consecuentemente, el U6 snRNA se acumulan diferencialmente en respuesta a estrés abiótico en Arabidopsis.

3.8. El complejo LSM2-8 regula diferencialmente la tolerancia de Arabidopsis a distintos estreses abióticos

En nuestro laboratorio se había demostrado que el complejo LSM2-8 regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis (Hernández-Verdeja, 2015), lo que sugería que, al igual que el complejo LSM1-7, también podría estar implicado en el control de la tolerancia al estrés hídrico y salino. Para testar esta hipótesis, estudiamos la tolerancia de plántulas mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2* a la sequía y altas concentraciones de sal de manera similar a como se realizó con las plántulas *lsm1a lsm1b* (ver sección 3.1). Después de una semana de crecimiento en placas con medio GM infusionadas con 25% PEG, las plántulas *lsm8-1* y *lsm8-2* no mostraron diferencias significativas respecto a las plantas silvestres, ni en términos de peso fresco ni de número de raíces laterales (Fig. 13A, B). Tampoco se detectaron diferencias cuando los ensayos de tolerancia a la sequía se llevaron a cabo con plantas crecidas en tierra. (Fig. 13C). Sin embargo, cuando las plántulas *lsm8* se expusieron durante siete días a 150 mM NaCl mostraron un mayor acortamiento de la raíz principal y un menor peso fresco que las plántulas silvestres (Fig. 14A, B). Además, cuando plantas mutantes que habían crecido en tierra fueron regadas con una solución de 250 mM NaCl durante 10 días mostraron una mayor pérdida de clorofila y un mayor número de hojas muertas que las plantas silvestres, manifestando una mayor sensibilidad al estrés salino (Fig. 14C). Todos estos resultados demostraban que la proteína LSM8, y por tanto el complejo LSM2-8, regula diferencialmente la tolerancia de Arabidopsis a distintos estreses abióticos. Este complejo no participa en el control de la tolerancia a la sequía, pero

funciona como regulador positivo de la tolerancia al estrés salino y regulador negativo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

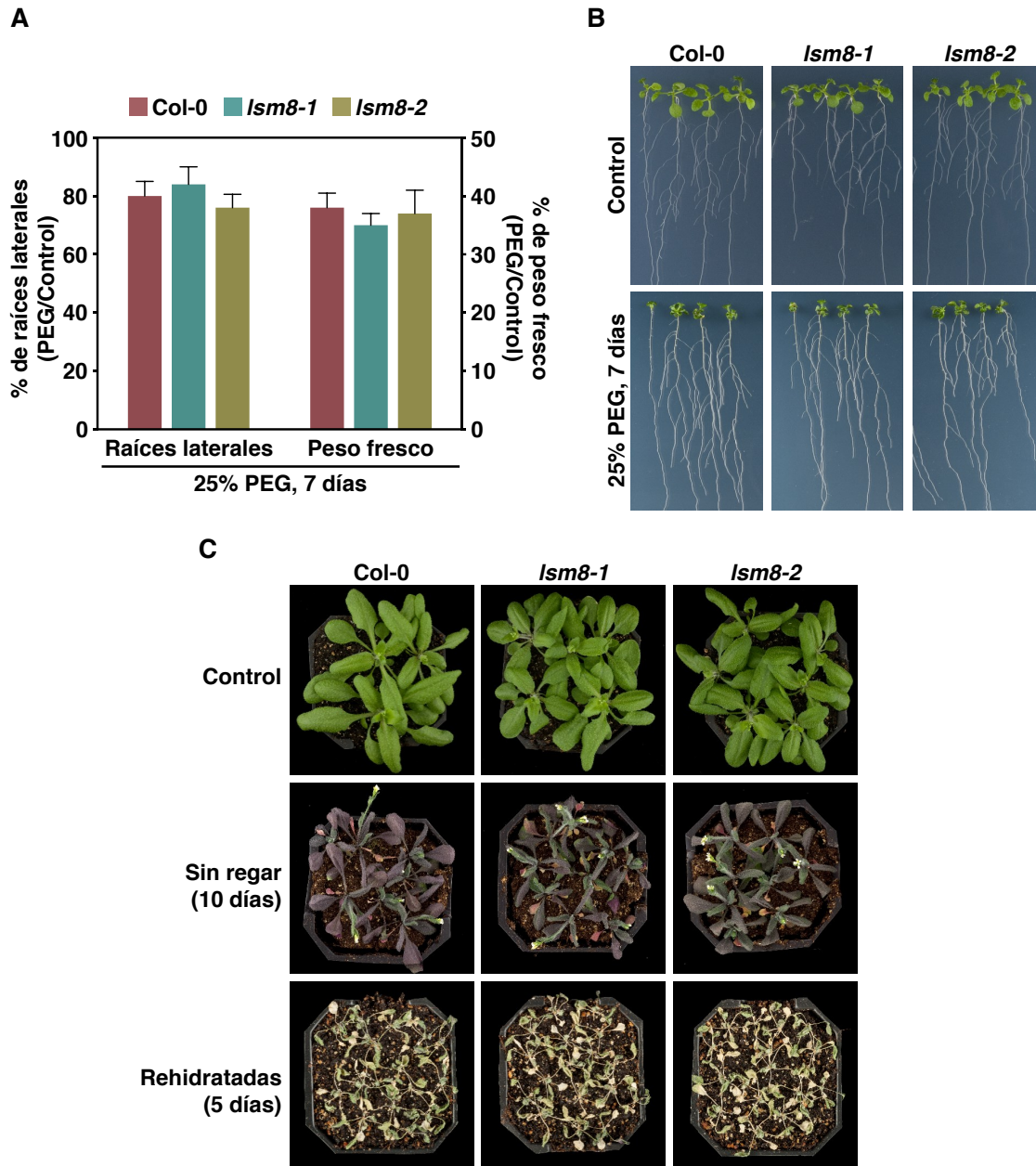


Figura 13. El complejo LSM2-8 no está implicado en la tolerancia de *Arabidopsis* a la sequía. (A) Cuantificación de la tolerancia al estrés hídrico de plántulas silvestres (Col-0), *lsm8-1* y *lsm8-2* de siete días de edad tras ser expuestas a 0% (Control) o 25% PEG durante siete días adicionales. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. (B y C) Imágenes representativas de plántulas crecidas en medio GM (control) o expuestas durante siete días a 25% PEG (B), y de plantas de dos semanas de edad crecidas en tierra en condiciones control a las que se les retiró el riego durante 10 días, tras lo cual se volvieron a regar durante cinco días adicionales (C).

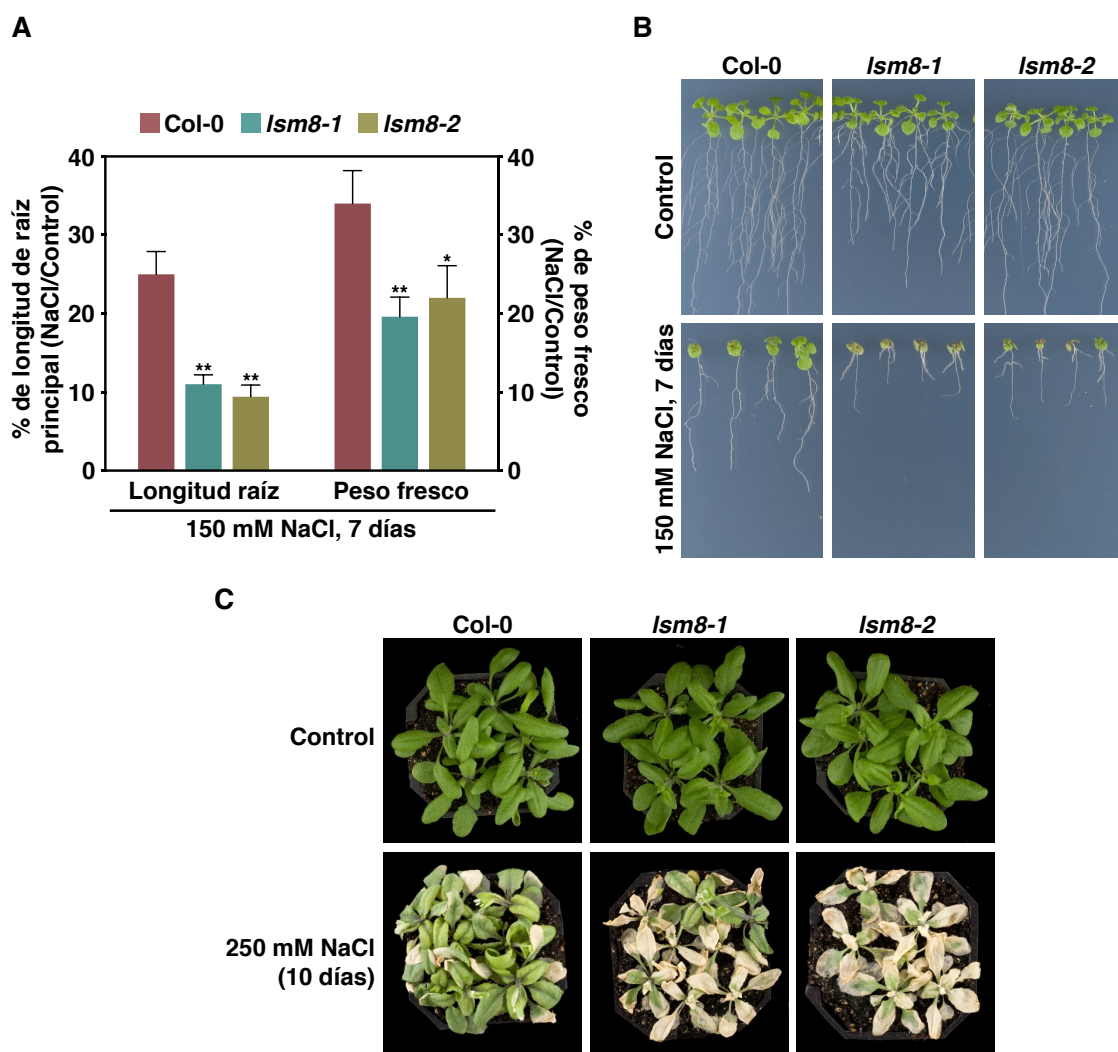


Figura 14. El complejo LSM2-8 regula positivamente la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino. (A) Cuantificación de la tolerancia al estrés salino de plántulas silvestres (Col-0), *lsm8-1* y *lsm8-2* de siete días de edad tras ser expuestas a 0 mM (Control) o 150 mM NaCl durante siete días adicionales. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$) entre los mutantes *lsm8* y las plantas Col-0 calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). (B y C) Imágenes representativas de plántulas crecidas en medio GM (control) o expuestas siete días adicionales a 150 mM NaCl (B), y de plantas de dos semanas de edad crecidas en tierra en condiciones control, que fueron regadas posteriormente cada dos días con 250 mM NaCl durante 10 días (C).

3.9. El complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* controla diferencialmente el *splicing* constitutivo y alternativo de pre-mRNAs en respuesta a distintos tipos de estreses abióticos

Los resultados obtenidos en esta tesis han demostrado que el complejo nuclear LSM regula diferencialmente la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés abiótico. Con el fin de determinar los mecanismos moleculares por los cuales lleva a cabo esa regulación, y teniendo en cuenta su implicación en el espliceosoma (Perea-Resa, 2012), estudiamos el impacto de la mutación *lsm8-1* en los patrones de *splicing* de plantas de *Arabidopsis* expuestas a 4°C y a estrés

salino mediante experimentos de RNA-seq de alta resolución. Estos análisis permitieron identificar 1060 y 2503 eventos de *splicing* alterados en los mutantes *lsm8-1* expuestos a frío y alta sal respecto a las plantas silvestres en las mismas condiciones (Tablas suplementarias 4 y 5). Estos eventos correspondían a 861 y 1860 genes diferentes, respectivamente (Fig. 15A). Dado que la retención de intrones era el evento significativamente más abundante en ambas condiciones de estrés (73,8% a 4°C y 88,9% en NaCl), los estudios posteriores se llevaron a cabo únicamente con este tipo de eventos.

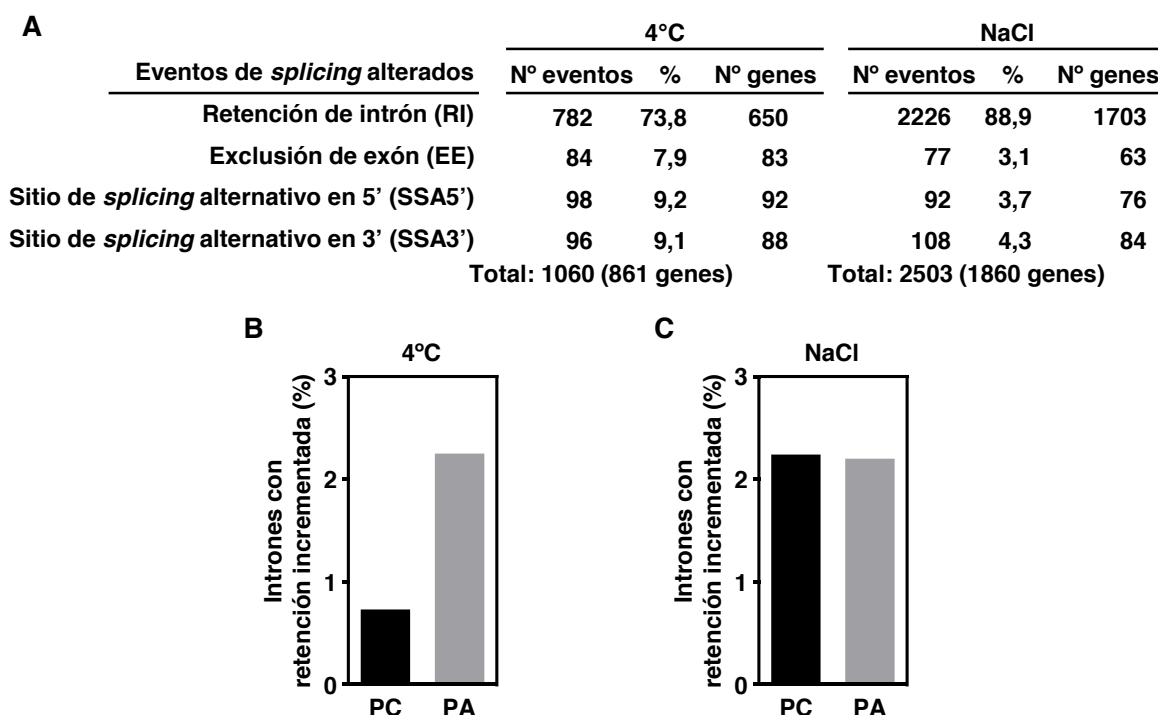


Figura 15. El complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* regula diferencialmente el *splicing* constitutivo y alternativo de pre-mRNAs en respuesta a temperaturas bajas y a estrés salino. (A) Identificación y cuantificación de eventos de *splicing* alterados (RI, EE, SSA5' y SSA3') en plantas *lsm8-1* respecto a plantas silvestres en condiciones de frío (4°C) o estrés salino (150 mM NaCl). Entre paréntesis se muestra el número total de genes distintos cuyos pre-mRNAs presentan defectos de *splicing* en cada una de las condiciones mencionadas. (B y C) Porcentaje de intrones procesados constitutiva (PC) o alternativamente (PA) con mayor retención en plantas *lsm8-1* expuestas a 4°C (B) o 150 mM NaCl (C) respecto al número total de intrones PC o PA identificados en plantas silvestres expuestas a estas mismas condiciones de crecimiento.

En respuesta a temperaturas bajas se detectaron 782 intrones retenidos en los mutantes *lsm8-1*, correspondientes a 650 genes, respecto a las plantas silvestres. Dependiendo de cómo son procesados en las plantas silvestres en esta condición, los intrones pueden ser clasificados en dos categorías distintas y excluyentes. El primer grupo incluye intrones que siempre son eliminados de los pre-mRNAs por el espliceosoma y que, por tanto, son denominados como intrones procesados constitutivamente. El segundo grupo comprende intrones procesados alternativamente, es decir, intrones que no son eliminados en todos los pre-mRNAs y, por tanto, están presentes en alguna versión de los mRNAs maduros de las plantas silvestres. De los intrones retenidos en *lsm8-1* a 4°C, 575 eran intrones procesados constitutivamente, lo

que representaba un 0,7% de todos los intrones constitutivos identificados en las plantas silvestres expuestas a frío (78291). Los 207 intrones retenidos restantes eran procesados alternativamente y representaban un 2,3% de todos los intrones alternativos detectados en las plantas silvestres expuestas a 4°C (9182) (Fig. 15B). En las plantas *lsm8-1* expuestas a 150 mM NaCl, se identificaron 2226 intrones retenidos, correspondientes a 1703 genes, respecto a las plantas silvestres. De los 2226 intrones retenidos, 1845 eran intrones que se procesan constitutivamente y 381 intrones que se procesan alternativamente en las plantas silvestres sometidas a estrés salino. En ambos casos, estos intrones representaban, aproximadamente, un 2,2% de todos los intrones procesados tanto constitutiva (82278) como alternativamente (17283) detectados en plantas silvestres expuestas a NaCl (Fig. 15C).

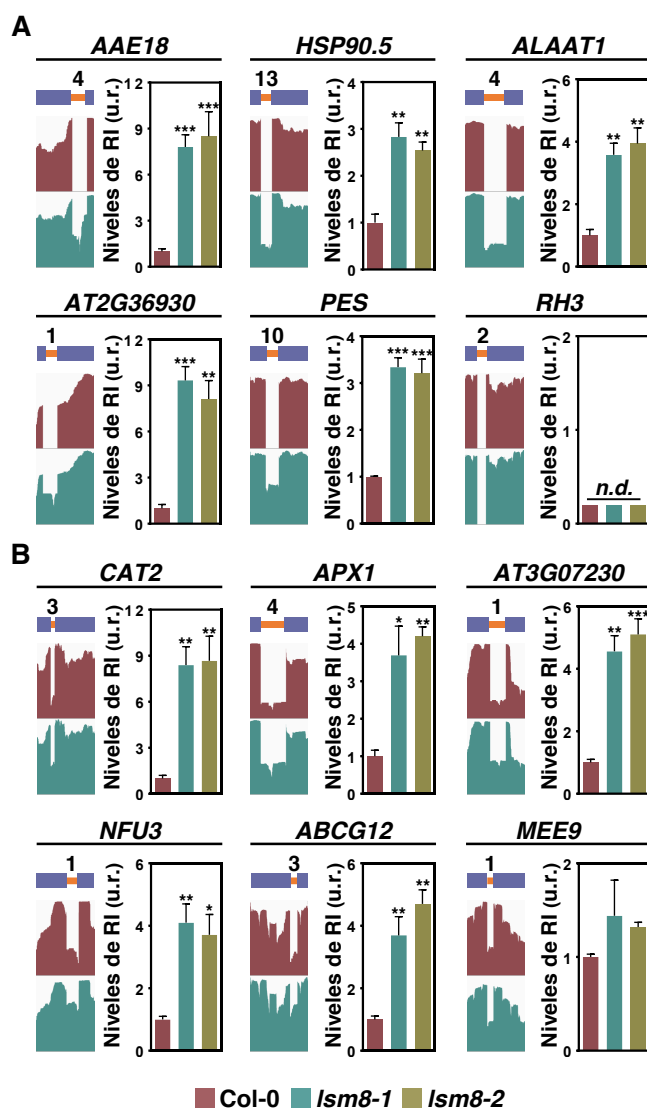


Figura 16. El complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* controla el *splicing* de intrones procesados constitutiva y alternativamente en respuesta a temperaturas bajas. Intrones procesados constitutiva (A) o alternativamente (B) que están retenidos en las plantas mutantes *lsm8* en condiciones de 4°C. En cada caso se indica el nombre del gen que contiene el correspondiente intrón con defectos en su *splicing*. A la izquierda se muestra un esquema de las regiones del pre-mRNA, incluyendo el intrón retenido (rectángulo naranja) junto con su posición relativa al modelo génico representativo, los exones adyacentes (rectángulos morados) y las imágenes que representan los niveles de expresión (lecturas alineadas) de cada región del pre-mRNA obtenidas con el programa IGV. A la derecha se muestran las cuantificaciones, determinadas por qPCR, de la retención del intrón en plantas silvestres (Col-0), *lsm8-1* y *lsm8-2* expuestas a 4°C durante 24 horas. En todos los casos, uno de los oligonucleótidos estaba situado dentro del intrón retenido y el otro en un exón adyacente. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (*P≤0,01; **P≤0,001; ***P≤0,0001) entre los mutantes *lsm8* y las plantas Col-0 calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). n.d. indica eventos no detectados mediante qPCR y u.r. indica unidades relativas.

Los eventos de retención de intrones detectados en el análisis de RNA-seq, incluyendo eventos cuyo procesamiento no está afectado en *lsm8-1*, se validaron mediante qPCR utilizando muestras independientes de RNA procedentes de plantas silvestres, *lsm8-1* y *lsm8*

-2 sometidas a 4°C o 150 mM NaCl. En todos los casos, los patrones de retención de intrón coincidían con los inferidos a partir de los datos de RNA-seq (Fig. 16 y 17), demostrando que el complejo LSM2-8 regula diferencialmente el *splicing* de intrones constitutivos y alternativos en respuesta a temperaturas bajas y alta sal en *Arabidopsis*. Mientras que en el caso del estrés por frío la función del complejo LSM2-8 es más relevante en los intrones procesados alternativamente, en respuesta a estrés salino el complejo actúa de manera similar sobre ambos tipos de intrones.

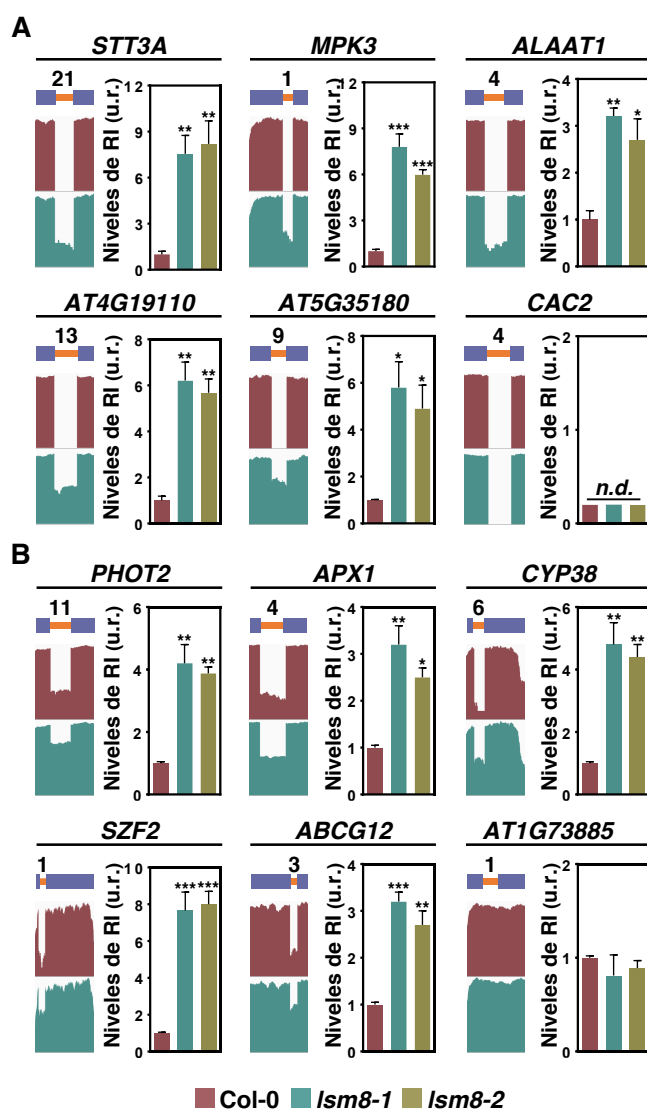


Figura 17. El complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* controla el *splicing* de intrones procesados constitutiva y alternativamente en respuesta a estrés salino. Intrones procesados constitutiva (A) o alternativamente (B) que están retenidos en las plantas mutantes *lsm8* expuestas a 150 mM NaCl. En cada caso se indica el nombre del gen que contiene el correspondiente intrón con defectos en su *splicing*. A la izquierda se muestra un esquema de las regiones del pre-mRNA, incluyendo el intrón retenido (rectángulo naranja) junto con su posición relativa al modelo génico representativo, los exones adyacentes (rectángulos morados) y las imágenes que representan los niveles de expresión (lecturas alineadas) de cada región del pre-mRNA obtenidas con el programa IGV. A la derecha se muestran las cuantificaciones, determinadas por qPCR, de la retención del intrón en plantas silvestres (Col-0), *lsm8-1* y *lsm8-2* expuestas a 150 mM NaCl durante 10 horas. En todos los casos, uno de los oligonucleótidos estaba situado dentro del intrón retenido y el otro en un exón adyacente. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0001$) entre los mutantes *lsm8* y las plantas Col-0 calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). n.d. indica eventos no detectados mediante qPCR y u.r. indica unidades relativas.

3.10. El complejo LSM2-8 controla el *splicing* de intrones específicos de pre-mRNAs implicados en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés abiótico, dependiendo de las condiciones de estrés

Los datos descritos en la sección anterior sugerían que el complejo nuclear LSM de *Arabidopsis* podría controlar el *splicing* de intrones específicos, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentran las plantas. Para estudiar esta posibilidad,

se compararon los intrones cuyo *splicing* es mediado por el complejo LSM2-8 en condiciones de 4°C y 150 mM NaCl. Estos análisis mostraron que 380 (92,5%) y 1211 (97,5%) intrones procesados constitutivamente son regulados, específicamente, por este complejo en respuesta a temperaturas bajas y estrés salino, respectivamente (Fig. 18A). En el caso de los intrones procesados alternativamente, 111 (95,7%) y 181 (97,3%) son controlados, específicamente, por el complejo LSM2-8 en respuesta a frío y alta sal, respectivamente (Fig. 18B). Tan sólo 31 intrones procesados constitutivamente y 5 intrones procesados alternativamente son regulados por el complejo en plantas expuestas a ambas condiciones de estrés (Fig. 18A, B).

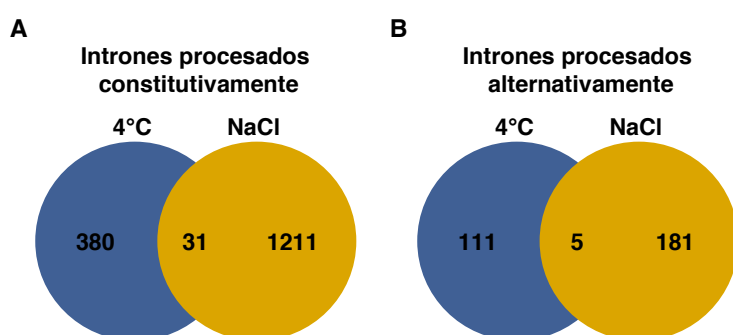


Figura 18. El complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* controla el procesamiento de intrones específicos en respuesta a diferentes estreses abióticos. Diagramas de Venn que muestran el solapamiento entre los intrones procesados constitutiva (A) o alternativamente (B) cuyo *splicing* es mediado por el complejo LSM2-8 en condiciones de 4°C o en respuesta a 150 mM NaCl. En cada caso se indica el número de intrones específicos y comunes.

Los análisis de especificidad llevados a cabo a partir de los experimentos de RNA-seq se validaron mediante qPCR, utilizando muestras independientes de RNA procedentes de plantas silvestres, *lsm8-1* y *lsm8-2* expuestas a 4°C o 150 mM NaCl. Se analizaron eventos de retención de intrones constitutivos y alternativos específicos de cada condición de estrés, y eventos no específicos. (Fig. 19, 20). Estos resultados pusieron en evidencia que el complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* controla el *splicing* de grupos diferentes de pre-mRNAs, dependiendo de las condiciones de estrés a las que están sometidas las plantas.

El análisis de ontogenia de los genes cuyos intrones son procesados por el complejo LSM2-8 específicamente en respuesta a frío o alta sal reveló que un número significativo de ellos está involucrado en la respuesta de las plantas al estrés abiótico, concretamente a las temperaturas bajas y al estrés salino, respectivamente (Fig. 21A, B). En efecto, de las seis primeras categorías de ontología génica enriquecidos significativamente entre los genes con intrones procesados a 4°C, "Respuesta a temperaturas bajas" fue la que presentó el valor

más alto de enriquecimiento respecto a la anotación obtenida del TAIR10 ($P=2,6E^{-5}$) (Fig. 21A). En el caso de los genes con intrones procesados por el complejo LSM2-8 específicamente en respuesta a NaCl, "Respuesta a estrés salino" fue la segunda categoría con el valor más alto de enriquecimiento ($P=6,7E^{-12}$) (Fig. 21B). Es importante destacar que entre los genes de la clase "Respuesta a temperaturas bajas" se encontraban reguladores negativos del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas, como *PRR5*, *RVE1* y *AHK3* (Jeon, 2010; Guan, 2013; Meissner, 2013), y entre los genes de la categoría "Respuesta a estrés salino" había reguladores positivos de la tolerancia a estrés salino, incluyendo *SAT32*, *NHX1* y *SIS* (Apse, 1999; Park, 2009; Luhua, 2013). Los eventos de retención de intrones en estos genes se validaron mediante qPCR, confirmando, en todos los casos, los resultados de RNA-seq (Fig. 21C, D). Dado que las alteraciones en el *splicing* de los pre-mRNAs afecta en la mayoría de los casos a la función de las proteínas correspondientes (Yu, 2016), es muy posible que los defectos en el procesamiento de los transcritos de los genes reguladores

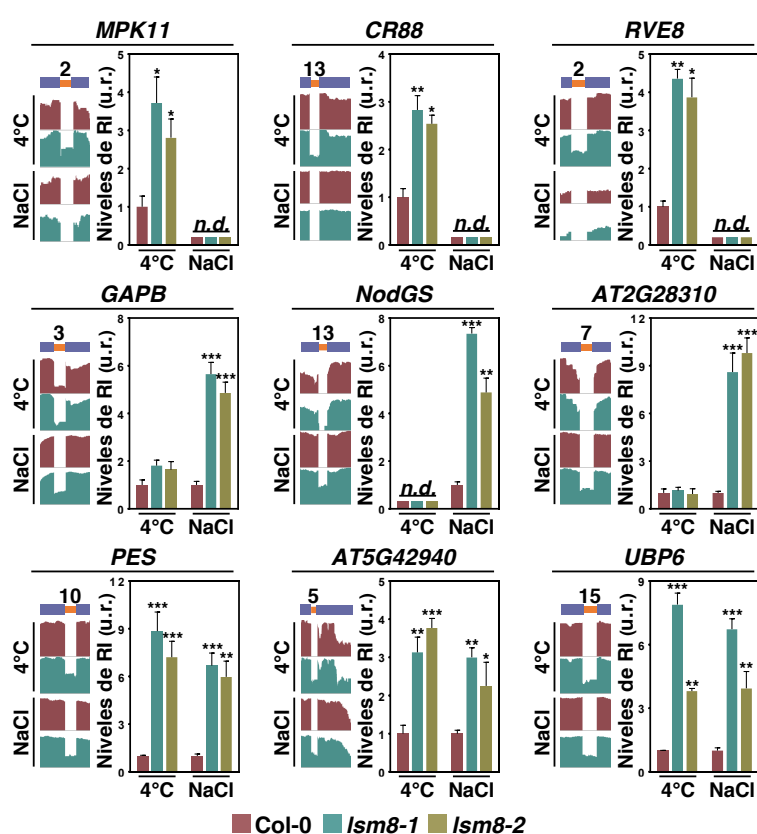


Figura 19. El complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* controla el *splicing* de intrones específicos procesados constitutivamente en respuesta a diferentes estreses abióticos. Intrones procesados constitutivamente que están retenidos en las plantas mutantes *lsm8* en condiciones de 4°C (primera línea), 150 mM NaCl (segunda línea) o en ambas condiciones de estrés (tercera línea). En cada caso se indica el nombre del gen que contiene el correspondiente intrón con defectos en su *splicing*. A la izquierda se muestra un esquema de las regiones del pre-mRNA, incluyendo el intrón retenido (rectángulo naranja) junto con su posición relativa al modelo génico representativo, los exones adyacentes (rectángulos morados) y las imágenes que representan los niveles de expresión (lecturas alineadas) de cada región del pre-mRNA obtenidas con el programa

IGV. A la derecha se muestran las cuantificaciones, determinadas por qPCR, de la retención del intrón en plantas silvestres (Col-0), *lsm8-1* y *lsm8-2* expuestas a 4°C o 150 mM NaCl. En todos los casos, uno de los oligonucleótidos estaba situado dentro del intrón retenido y el otro en un exón adyacente. Las barras representan las medias ($n=3$) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,01$; ** $P \leq 0,001$; *** $P \leq 0,0001$) entre los mutantes *lsm8* y las plantas Col-0 calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). n.d. indica eventos no detectados mediante qPCR y u.r. indica unidades relativas.

mencionados anteriormente sean la causa de la mayor capacidad para aclimatar y de la menor tolerancia al estrés salino que muestran los mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2*. En conjunto, todos estos resultados demostraron que el complejo LSM2-8 regula diferencialmente la tolerancia al estrés abiótico en *Arabidopsis*, asegurando el correcto *splicing* de intrones específicos de genes implicados en dicha tolerancia, dependiendo, en cada caso, de las condiciones de estrés.

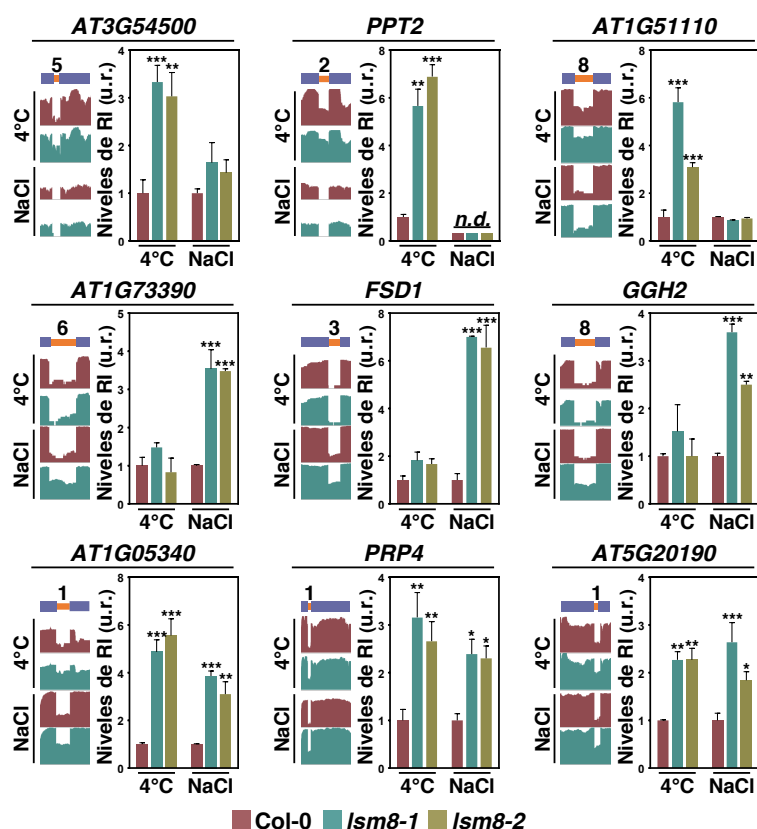


Figura 20. El complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* controla el *splicing* de intrones específicos procesados alternativamente en respuesta a diferentes estreses abióticos. Intrones procesados alternativamente que están retenidos en las plantas mutantes *lsm8* en condiciones de 4°C (primera línea), 150 mM NaCl (segunda línea) o en ambas condiciones de estrés (tercera línea). En cada caso se indica el nombre del gen que contiene el correspondiente intrón con defectos en su *splicing*. A la izquierda se muestra un esquema de las regiones del pre-mRNA, incluyendo el intrón retenido (rectángulo naranja) junto con su posición relativa al modelo génico representativo, los exones adyacentes (rectángulos morados) y las imágenes que representan los niveles de expresión (lecturas alineadas) de cada región del pre-mRNA obtenidas con el programa IGV. A la derecha se muestran las cuantificaciones, determinadas por qPCR, de la retención del intrón en plantas silvestres (Col-0), *lsm8-1* y *lsm8-2* expuestas a 4°C o 150 mM NaCl. En todos los casos, uno de los oligonucleótidos estaba situado dentro del intrón retenido y el otro en un exón adyacente. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (*P≤0,01; **P≤0,001; ***P≤0,0001) entre los mutantes *lsm8* y las plantas Col-0 calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). n.d. indica eventos no detectados mediante qPCR y u.r. indica unidades relativas.

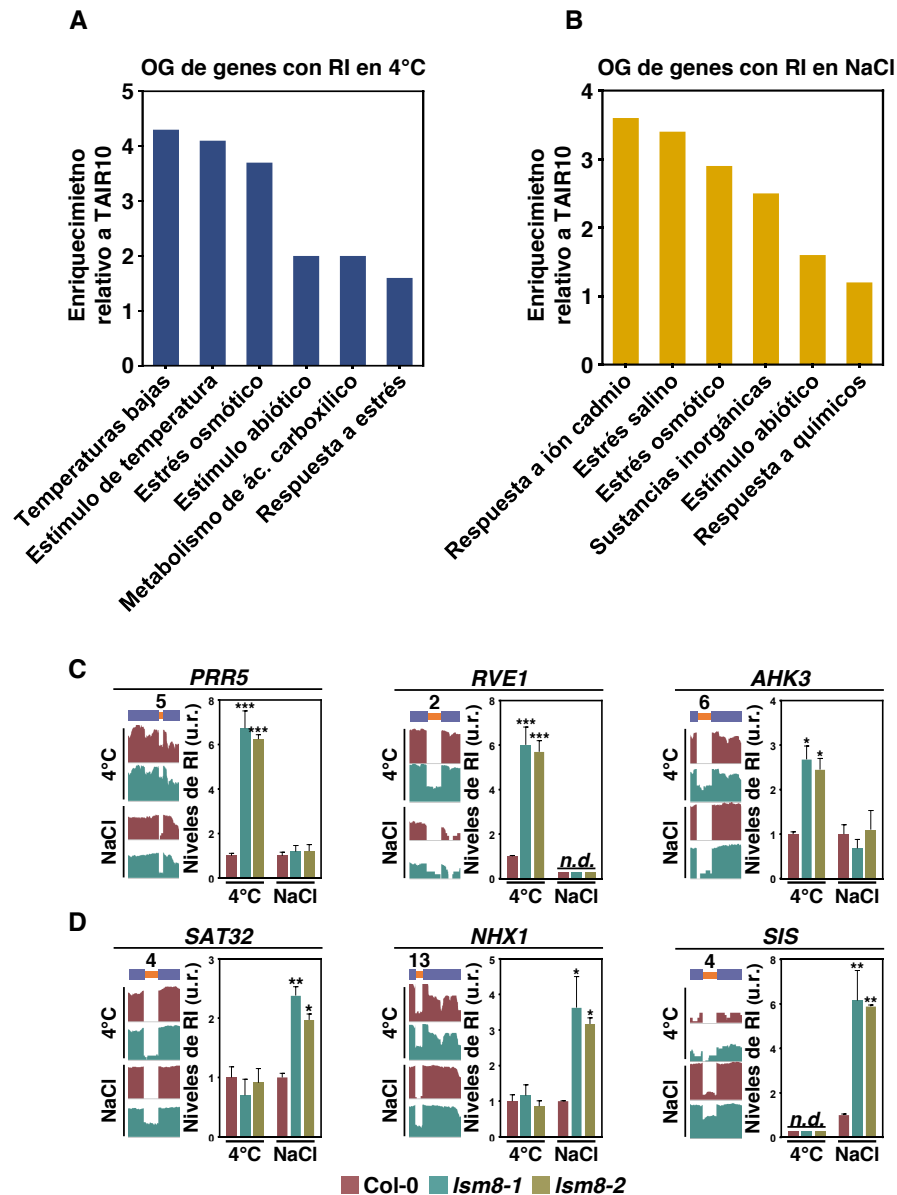


Figura 21. El complejo LSM2-8 controla el *splicing* de transcritos específicos implicados en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés abiótico, dependiendo de las condiciones de estrés. (A y B) Análisis de ontología génica (OG) de genes que contienen intrones procesados constitutiva o alternativamente cuyo *splicing* es controlado por el complejo LSM2-8 específicamente en respuesta a frío (A) o estrés salino (B). En ambos casos las barras representan el enriquecimiento de genes con intrones retenidos en los mutantes *lsm8-1* relativo al número total de genes anotados en el genoma de *Arabidopsis* (TAIR10) en la respectiva categoría ontológica. (C y D) Intrones procesados constitutiva o alternativamente que están retenidos específicamente en las plantas mutantes *lsm8* expuestas a 4°C (C) o 150 mM NaCl (D) que pertenecen a genes implicados en la tolerancia de *Arabidopsis* a las heladas o al estrés salino, respectivamente. En cada caso se indica el nombre del gen que contiene el correspondiente intrón con defectos en su *splicing*. A la izquierda se muestra un esquema de las regiones del pre-mRNA, incluyendo el intrón retenido (rectángulo naranja) junto con su posición relativa al modelo génico representativo, los exones adyacentes (rectángulos morados) y las imágenes que representan los niveles de expresión (lecturas alineadas) de cada región del pre-mRNA obtenidas con el programa IGV. A la derecha se muestran las cuantificaciones, determinadas por qPCR, de la retención del intrón en plantas silvestres (Col-0), *lsm8-1* y *lsm8-2* expuestas a 4°C o 150 mM NaCl. En todos los casos, uno de los oligonucleótidos estaba situado dentro del intrón retenido y el otro en un exón adyacente. Las barras representan las medias (n=3) junto con el error estándar. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (*P≤0,01; **P≤0,001; ***P≤0,0001) entre los mutantes *lsm8* y las plantas Col-0 calculadas mediante análisis de varianza (ANOVA). n.d. indica eventos no detectados mediante qPCR y u.r. indica unidades relativas.

4. DISCUSIÓN

4. Discusión

4.1. Implicación del complejo citoplásmico LSM1-7 en la respuesta de Arabidopsis a diferentes estreses abióticos

El control de la vida media de los mRNAs es un punto clave de regulación de la expresión génica. A día de hoy, sin embargo, no se conoce en detalle el papel que juegan los mecanismos de degradación de mensajeros en las respuestas de las plantas a estreses abióticos. En esta tesis, se ha demostrado que el complejo activador del *decapping* LSM1-7 tiene un papel fundamental en dichas respuestas modulando las vías de señalización que las median, en función de las condiciones ambientales adversas a las que están sometidas las plantas. Este complejo regula la tolerancia de Arabidopsis a la sequía y el estrés salino interaccionado específicamente con transcritos inducibles por esos estreses, promoviendo su *decapping* y posterior degradación, lo que garantiza unos patrones de expresión génica adecuados en cada caso. Así, por ejemplo, el complejo LSM1-7 modula los niveles de ABA en respuesta a distintos estreses abióticos controlando diferencialmente la acumulación de los mensajeros correspondientes a NCED5, una enzima clave de la síntesis de esta hormona, dependiendo del tipo de estrés.

Nuestros análisis de expresión, junto con resultados obtenidos previamente en el laboratorio, han revelado que los genes *LSM1A* y *LSM1B* de Arabidopsis son regulados diferencialmente en respuesta a diversos estreses abióticos. Sus mRNAs no se acumulan en respuesta a sequía o estrés salino, pero sí en respuesta a frío. Consistentemente, los niveles de las proteínas LSM1A y LSM1B aumentan únicamente en plantas expuestas a temperaturas bajas. Estas proteínas, no obstante, se acumulan en *P-bodies* en respuesta a frío, estrés hídrico y estrés salino, indicando que los mecanismos moleculares que determinan su localización en estos corpúsculos citoplásmicos son independientes de los niveles de proteína. Además, las proteínas LSM1 son esenciales para la formación de los *P-bodies*, sugiriendo que su ensamblaje es promovido por situaciones de estrés. Se ha descrito que, al igual que LSM1, otros componentes de la maquinaria de *decapping*, como LSM5/ SAD1, DCP1, DCP2 y VCS, también se localizan en *P-bodies* en respuesta a estrés abiótico, a pesar de que sus niveles no varían en condiciones de estrés (Motomura, 2015; Okamoto, 2016; Soma, 2017). Sin embargo, su implicación en la formación de *P-bodies* aún no se ha determinado. Los mecanismos que controlan las dinámicas citoplásmicas de las proteínas implicadas en la degradación de mRNAs y, en última instancia, en la formación de *P-bodies* en respuesta al estrés ambiental, son poco conocidos. Se ha sugerido que los niveles de fosforilación de diferentes componentes de la maquinaria de *decapping* pueden determinar su localización citoplásmica y el consiguiente ensamblaje de los *P-bodies*. La proteína PAT1

es fosforilada por MPK4 en tratamientos con flagelina, el componente principal del flagelo bacteriano, provocando su acumulación y localización en *P-bodies* en respuesta a patógenos (Roux, 2015). Por el contrario, la fosforilación de DCP1a en humanos por la proteína quinasa JNK desencadena la disgregación de estos corpúsculos citoplásmicos (Rzeczkowski, 2011). El análisis de la secuencia aminoacídica de las proteínas LSM1 indicó que contienen un motivo de fosforilación que es diana de proteínas MPKs. Es posible, por tanto, que en respuesta a estrés abiótico la fosforilación de las LSM1 por MPKs podría regular su localización en *P-bodies*.

El control diferencial de la expresión de los genes *LSM1* y la acumulación de las proteínas correspondientes por el medio ambiente parece tener claras consecuencias funcionales. De hecho, el complejo citoplásmico LSM regula diferencialmente la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés abiótico. Por un lado, regula negativamente su tolerancia a la sequía y su capacidad de aclimatar a las temperaturas bajas, y por otro, funciona como regulador positivo de su tolerancia al estrés salino. Los análisis transcriptómicos de plantas *lsm1a lsm1b* han desvelado que el complejo LSM1-7 participa en la reprogramación génica que media estas tolerancias. Curiosamente, el análisis comparativo de los cientos de genes cuyos niveles de expresión están alterados en las plantas *lsm1a lsm1b* en condiciones de estrés hídrico y salino reveló que un buen número de mensajeros son regulados específicamente por el complejo LSM1-7, dependiendo de la situación de estrés. Estos resultados indican, por tanto, que este complejo controla la expresión génica en respuesta a diferentes situaciones de estrés a través de vías de señalización específicas y comunes. Es interesante el hecho de que numerosos genes cuya expresión es controlada por el complejo LSM1-7 de manera específica dependiendo del estrés, están implicados en la tolerancia de las plantas a esa condición adversa. Así, en condiciones de sequía, el complejo modula los niveles de transcritos que codifican reguladores positivos de la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés hídrico, incluyendo ABR1, ANAC019 y ERF53 (Tran, 2004; Pandey, 2005; Cheng, 2012). En respuesta a alta salinidad, sin embargo, controla la acumulación de mRNAs de importantes reguladores negativos de la tolerancia a este estrés, tales como ANAC092, AHK5 y ATGSTU17 (Balazadeh, 2010; Chen, 2012; Pham, 2012). El complejo citoplásmico LSM, por consiguiente, cumple un papel fundamental en la adaptación de *Arabidopsis* a distintos tipos de estrés abiótico, determinando los patrones adecuados de expresión génica en cada caso. Nuestros resultados suponen la primera evidencia de la implicación de un componente de la maquinaria de *decapping* de mRNAs, como es el complejo LSM1-7, en el control diferencial de la respuesta al medio ambiente en eucariotas. Aunque otros activadores del *decapping*, como DCP5 (Xu, 2012) y VCS (Soma, 2017), también han sido implicados en la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés abiótico, se desconoce

si, al igual que el complejo LSM1-7, tienen funciones diferentes dependiendo de las condiciones ambientales.

Los datos obtenidos en esta tesis han permitido, además, determinar el mecanismo por el cual el complejo LSM1-7 controla diferencialmente la reprogramación del transcriptoma en respuesta a distintos estreses abióticos en *Arabidopsis* y, por lo tanto, su adaptación a dichos estreses. El análisis de la interacción entre mRNAs y la proteína LSM1 a través de ensayos RIP, junto con la cuantificación de mRNAs con estructura 5'CAP en plantas mutantes *lsm1a lsm1b*, ha demostrado que el complejo citoplásmico LSM funciona como activador del *decapping* de mRNAs inducibles por estrés hídrico o salino que codifican proteínas implicadas en la tolerancia de *Arabidopsis* a dichos estreses. Es de destacar que algunos de estos mensajeros diana del complejo son seleccionados específicamente en cada situación de estrés, mientras que otros son dianas en respuesta a varios estreses. En consecuencia, podemos concluir que la regulación diferencial de los niveles de estos transcritos por el complejo LSM1-7 garantiza una expresión génica adecuada y específica en condiciones de sequía y estrés salino que, en última instancia, activaría los correspondientes mecanismos de tolerancia a esas situaciones de estrés.

Uno de los mRNAs diana específicos del complejo LSM1-7 en respuesta al estrés salino es *NCED5*, el cual codifica una enzima fundamental en la biosíntesis de ABA en *Arabidopsis* (Tan, 2003; Frey, 2011). Los niveles de esta hormona aumentan muy significativamente en plantas expuestas a sequía o altas concentraciones de sal, desempeñando un papel crítico en la tolerancia de las plantas a estos estreses (Jia, 2002; Wu, 2009). Nuestros datos demuestran, como era de esperar, que el complejo citoplásmico LSM controla esos niveles únicamente en condiciones de alta sal. Hasta el momento, los resultados descritos en la literatura sugerían que la expresión de los genes *NCED* y, por lo tanto, la síntesis de ABA en respuesta a diferentes estreses abióticos, estaba regulada, principalmente, a nivel transcripcional (Barrero, 2006; Frey, 2011). El complejo citoplásmico LSM, por tanto, controla la inducción de *NCED5* por NaCl a nivel postranscripcional, revelando una nueva categoría de regulación de la biosíntesis de ABA en respuesta a estreses abióticos en *Arabidopsis*.

4.2. El complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* regula el *splicing* de pre-mRNAs específicos en respuesta a diferentes estreses abióticos

La comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la actividad del espliceosoma es esencial para descifrar el control postranscripcional de la expresión génica. En esta tesis se presentan evidencias genéticas y moleculares de que el complejo

nuclear LSM, un componente central del espliceosoma, regula diferencialmente la tolerancia de *Arabidopsis* al estrés salino y a las heladas, asegurando el correcto *splicing* de pre-mRNAs específicos dependiendo de las condiciones de estrés.

Previamente, en nuestro laboratorio, se había determinado que el complejo LSM2-8 regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*. Aquí, nos planteamos estudiar si este complejo podría también estar implicado en la tolerancia de *Arabidopsis* a dos estreses muy relacionados con las temperaturas bajas, como son la sequía y el estrés salino. Nuestros experimentos han puesto de manifiesto que el complejo nuclear LSM de *Arabidopsis* regula positivamente la tolerancia a altas concentraciones de sal, pero no está implicado en la tolerancia a la sequía, demostrando, por primera vez en eucariotas, la capacidad de un componente estructural del espliceosoma para regular diferencialmente la adaptación de los seres vivos a su entorno. La caracterización molecular del complejo LSM2-8 ha demostrado que este complejo y el U6 snRNA se acumulan en respuesta a 4°C, pero no a NaCl. Ding y colaboradores han descrito que los niveles de U6 snRNA disminuyen a las tres horas de tratamiento con 300 mM NaCl (Ding, 2014), sin embargo, las condiciones experimentales utilizadas en este estudio difieren significativamente de las nuestras, lo cual podría explicar los diferentes patrones de expresión del U6 snRNA observados en ambos trabajos. Los niveles de U1 snRNA también aumentan cuando las plantas son expuestas a 10°C, aunque no se han estudiado sus patrones de expresión en respuesta a otros estreses abióticos (Schlaen, 2015). Se ha propuesto que la modulación de la acumulación de proteínas espliceosomales podría funcionar como un mecanismo de control de la actividad del espliceosoma (Perez-Santángelo, 2014; Papasaikas, 2015). Por tanto, las variaciones en la acumulación del complejo LSM2-8 y el U6 snRNA en respuesta a diferentes estímulos ambientales podría ser un mecanismo de regulación de la actividad del espliceosoma.

Confirmando la hipótesis anterior, los análisis transcriptómicos en plantas *lsm8-1* expuestas a 4°C o NaCl han revelado que el complejo nuclear LSM de *Arabidopsis* asegura el correcto *splicing* de diferentes pre-mRNAs. La comparación de los intrones cuyo procesamiento está alterado en los mutantes *lsm8-1* en condiciones de frío o estrés salino, demostró que el complejo regula específicamente el *splicing* de distintos intrones, procesados tanto constitutiva como alternativamente, dependiendo del tipo de estrés. Además, mientras que en condiciones de frío regula principalmente el *splicing* de intrones procesados alternativamente, en presencia de altas concentraciones de sal controla de manera similar el *splicing* de intrones procesados constitutiva y alternativamente. Así pues, nuestros datos ponen de manifiesto que la función del complejo LSM2-8 está influenciada por las

situaciones ambientales que rodean a las plantas. Perez-Santangelo y colaboradores han propuesto que las proteínas LSM4 y LSM5 de *Arabidopsis* participan en el control del *splicing* de pre-mRNAs, con un efecto predominante sobre los intrones procesados alternativamente (Perez-Santangelo, 2014). Cada una de estas proteínas regularía, selectivamente, el *splicing* de un grupo particular de intrones, sin embargo, no se ha determinado si esta selectividad podría estar modulada por diferentes estímulos externos. En humanos, las proteínas LSM2, LSM3, LSM4, LSM6 y LSM7 también se han relacionado con la selección de sitios de *splicing* (Papasaikas, 2015). No obstante, la participación simultánea de todas estas proteínas LSM en los complejos nuclear y citoplásmico dificulta la interpretación de la relevancia real de estos complejos en la regulación del *splicing* de pre-mRNAs. Dado que la proteína LSM8 es la subunidad esencial para la formación del complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* y, por ende, del U6 snRNP, los resultados presentados en esta tesis permiten establecer, definitivamente, que este complejo y, en consecuencia, el U6 snRNP, determinan los patrones de *splicing* en respuesta a temperaturas bajas y estrés salino. Esta función está modulada diferencialmente por las condiciones ambientales, lo que representa un nuevo mecanismo regulador de la especificidad de la actividad del espliceosoma en eucariotas.

Los análisis transcriptómicos revelaron también que, entre los intrones cuyo procesamiento asegura el complejo LSM2-8 específicamente cuando las plantas están expuestas a 4°C o NaCl, varios de ellos pertenecen a genes que codifican intermediarios importantes de la tolerancia de *Arabidopsis* a estos estreses como son PRR5, RVE1 y AHK3 (Jeon, 2010; Guan, 2013; Meissner, 2013), en el caso de las heladas, y SAT32, NHX1 y SIS (Apse, 1999; Park, 2009; Luhua, 2013), en el estrés salino. La función del complejo LSM2-8 y, consecuentemente la del U6 snRNP, parece necesaria, por tanto, para asegurar el correcto *splicing* de pre-mRNAs correspondientes a proteínas implicadas en la tolerancia de *Arabidopsis* a estrés abiótico. Ha sido descrito que los mutantes *lsm4* y *lsm5/sad1* de *Arabidopsis* también son sensibles al estrés salino como consecuencia de un patrón alterado de *splicing* (Zhang, 2011; Cui, 2014b). La comparación entre los genes que muestran una retención de sus intrones en *lsm8-1* con los de *lsm5/sad1* en respuesta a NaCl, reveló que 291 son comunes (Fig. 22). Este limitado solapamiento podría deberse a las diferentes

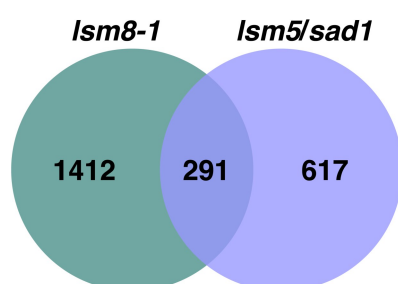


Figura 22. Comparación de genes cuyo *splicing* está alterado en los mutantes *lsm8-1* y *lsm5/sad1* en respuesta a estrés salino. Diagramas de Venn que muestran el solapamiento entre los genes que contienen intrones retenidos en los mutantes *lsm8-1* y *lsm5/sad1* en condiciones de alta sal. En cada caso se indica el número de genes específicos y comunes

condiciones experimentales utilizadas en ambos estudios, y a que LSM5 forma parte de los dos complejos LSM. A pesar de todo, algunos de los genes comunes codifican importantes reguladores positivos de la tolerancia de *Arabidopsis* a la salinidad, como SAT32 (Park, 2009), SIS (Luhua, 2013), RCD1 (Katiyar-Agarwal, 2006), SZF1 (Sun, 2007), WRKY33 (Jiang, 2009) y RCI2A (Mitsuya, 2005), lo que sugiere que este subconjunto podría estar enriquecido en genes con un papel clave en dicha tolerancia. Otros componentes del espliceosoma, como BRR1 de levadura (Noble, 1996a; Noble, 1996b) y SKIP (Feng, 2015), PRP31 (Du, 2015) y GEMIN2 (Schlaen, 2015) de *Arabidopsis*, aunque no forman parte central de los snRNPs, también han sido implicados en la regulación de la tolerancia a condiciones ambientales adversas mediante el control del *splicing* de pre-mRNAs. No obstante, en ningún caso se ha analizado la especificidad de sus funciones en respuesta a diferentes situaciones de estrés.

La pregunta que surge de los resultados expuestos anteriormente es: ¿cuáles son los determinantes moleculares que posibilitan la especificidad del complejo LSM2-8 en las respuestas de las plantas a las temperaturas bajas y al estrés salino? Una primera posibilidad es que los intrones regulados por este complejo pertenezcan a genes que se expresen únicamente bajo un tipo de estrés abiótico. Esta hipótesis, sin embargo, no es muy probable, ya que la mayoría de los genes que contienen intrones regulados específicamente por el complejo LSM2-8 no se transcriben diferencialmente en condiciones de frío o altas concentraciones de sal (Fig. 23). Una segunda posibilidad es que los intrones incluyan en sus

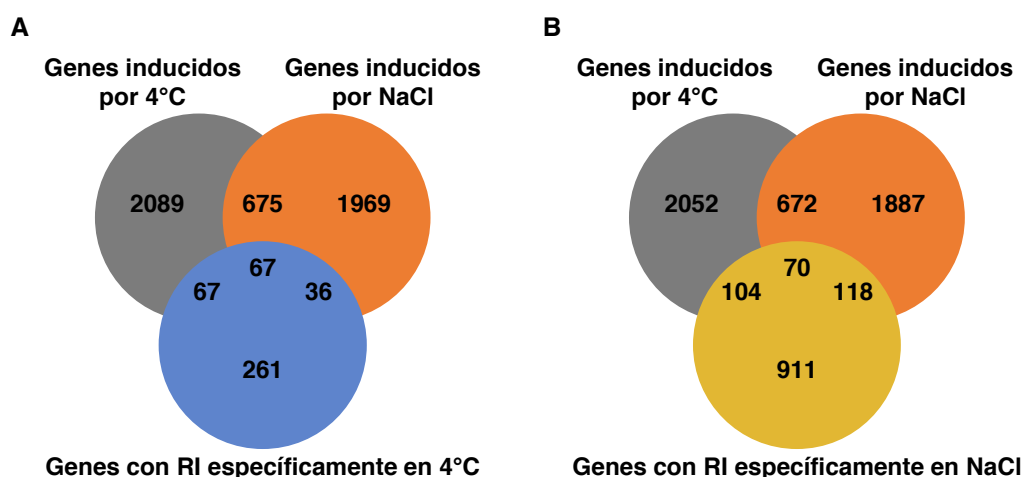


Figura 23. La mayoría de los genes cuyos intrones son regulados por el complejo LSM2-8 específicamente en respuesta a diferentes estreses abióticos, no se transcriben diferencialmente en estas condiciones. (A y B) Diagramas de Venn que muestran el solapamiento entre los genes con retención de sus intrones (RI) específicamente en los mutantes *lsm8-1* expuestos a 4°C (A) o 150 mM NaCl (B), y los genes que son inducidos en respuesta a temperaturas bajas (4°C; círculo gris) o estrés salino (150 mM NaCl; círculo naranja) en las plantas silvestres. En cada caso se indica el número de genes específicos y comunes.

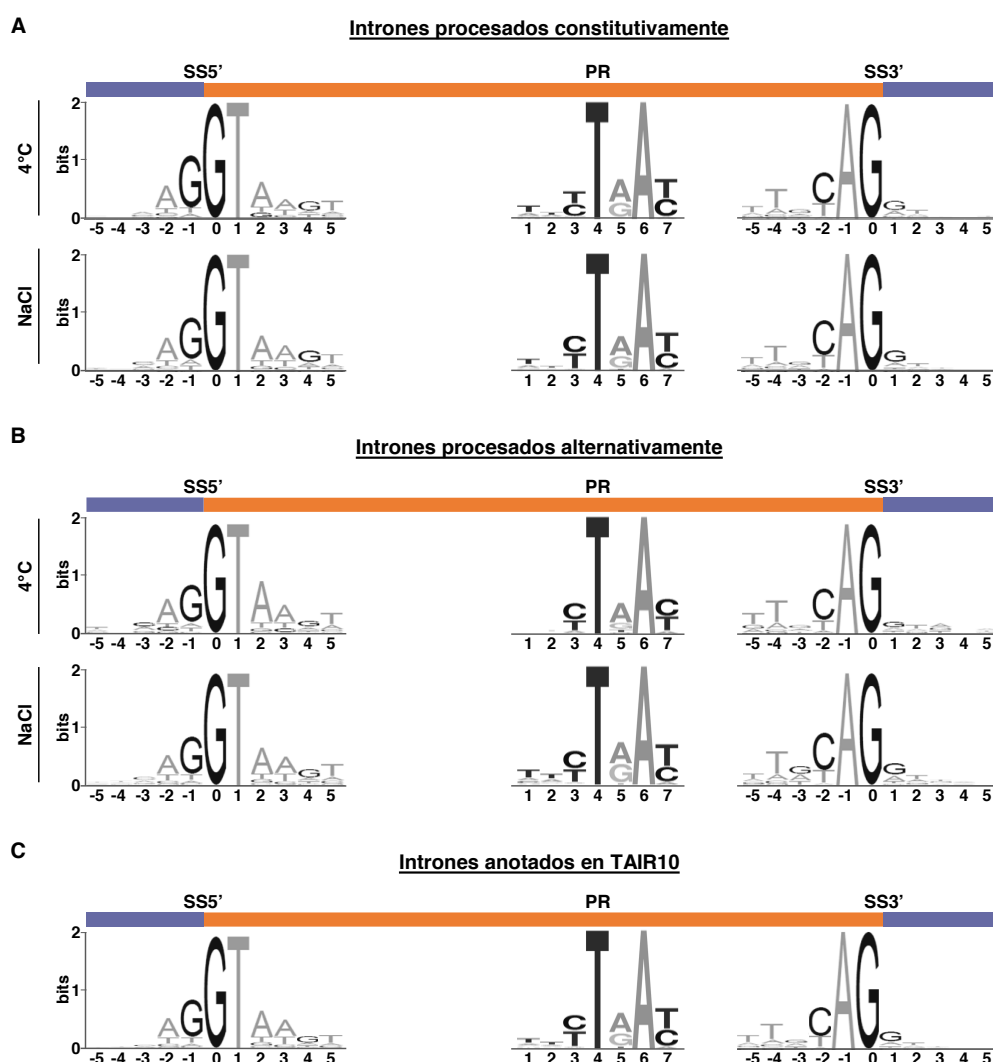


Figura 24. Los intrones procesados por el complejo LSM2-8 específicamente en respuesta a diferentes estreses abióticos no muestran diferencias significativas en la distribución de nucleótidos ni en los sitios de *splicing* 5' y 3', ni en el punto de ramificación con respecto a los intrones de *Arabidopsis* anotados en TAIR10. (A y B) Logos de secuencias de los sitios de *splicing* 5' (SS5') y 3' (SS3') y del punto de ramificación (PR) de intrones procesados constitutiva (A) o alternativamente (B) que están retenidos específicamente en los mutantes *lsm8-1* expuestos a temperaturas bajas (4°C) o estrés salino (NaCl). (C) Logos de secuencias de los SS5', SS3' y PR de todos los intrones anotados en TAIR10. En todos los casos se muestra un esquema de las regiones del pre-mRNA, incluyendo los intrones retenidos (rectángulo naranja) y los exones adyacentes (rectángulos morados).

secuencias nucleotídicas motivos específicos. En este caso, el análisis de las secuencias intrónicas utilizando el programa MEME, que permite detectar enriquecimientos de motivos particulares, y el análisis de las frecuencias de nucleótidos alrededor de los sitios de *splicing* 5' y 3' y del punto de ramificación, utilizando la aplicación WebLogo, no revelaron diferencias significativas entre los intrones procesados específicamente en respuesta a 4°C o NaCl ni con las secuencias consenso descritas para *Arabidopsis* (Fig. 24). En un trabajo publicado recientemente, Mahrez y colaboradores han demostrado que el factor de *splicing* de *Arabidopsis* BRR2a controla el procesamiento de un conjunto singular de intrones para regular el proceso de floración (Mahrez, 2016). Los autores proponen que BRR2a

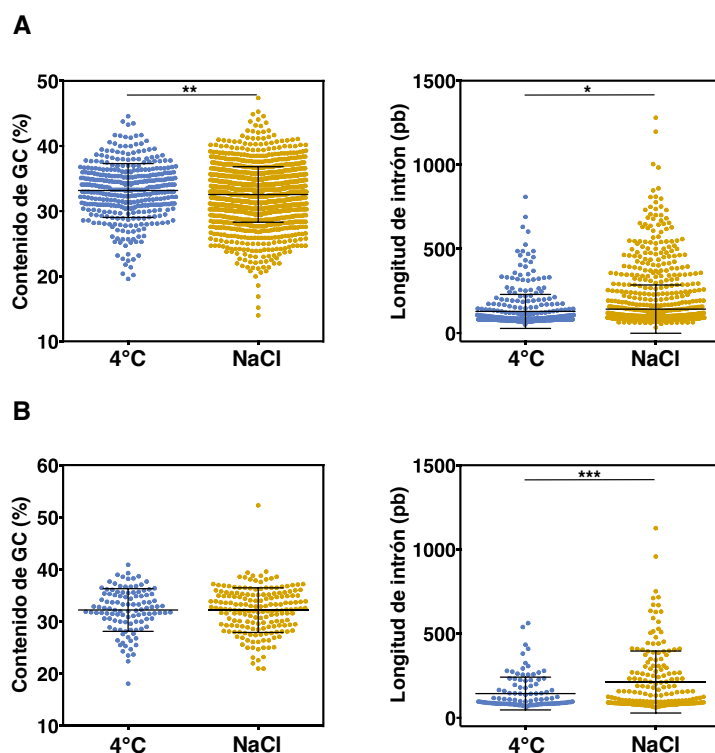


Figura 25. Los intrones procesados por el complejo LSM2-8 específicamente en respuesta a diferentes estreses abióticos muestran diferencias significativas en el contenido de GC y en la longitud, dependiendo de las condiciones de estrés. (A y B) Contenido de GC y longitud de intrones procesados constitutiva (A) o alternativamente (B) que están retenidos específicamente en los mutantes *lsm8-1* expuestos a temperaturas bajas (4°C) o estrés salino (NaCl). En todos los gráficos, las barras representan la desviación estándar de la media. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$) entre los valores obtenidos a 4°C y NaCl calculadas mediante una prueba de t de Student.

selecciona sus intrones diana basándose en su longitud y en su contenido en GCs. Nuestros datos sugieren que el complejo LSM2-8 también podría seleccionar algunos intrones regulados específicamente en respuesta a temperaturas bajas y estrés salino en función de su longitud y/o contenido en GCs. Así, los intrones procesados constitutivamente que son controlados específicamente por el complejo LSM2-8 en condiciones de frío, muestran un mayor contenido en GCs y una menor longitud que aquellos procesados en situaciones de alta sal (Fig. 25A). Además, los intrones procesados alternativamente que son controlados de manera específica por este complejo a 4°C son significativamente más cortos que los regulados en presencia de NaCl (Fig. 25B). Finalmente, estudios en humanos y plantas han demostrado que la dimetilación de LSM4 por la metiltransferasa PRMT5 es esencial para el ensamblaje del espliceosoma y el correcto *splicing* de pre-mRNAs (Brahms, 2001; Zhang, 2011). Es posible, por tanto, que la actividad del complejo LSM2-8 de *Arabidopsis* en respuesta a diferentes condiciones ambientales, pueda estar modulada mediante modificaciones postraduccionales.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

5.1. Los complejos LSM regulan diferencialmente la tolerancia de *Arabidopsis* a distintos tipos de estrés abiótico.

5.2. Los complejos LSM1-7 y LSM2-8 controlan la vida media y el *splicing* de mensajeros implicados en la tolerancia de *Arabidopsis* a estreses abióticos, respectivamente.

5.3. Dependiendo de las condiciones de estrés abiótico, el complejo LSM1-7 interacciona con mensajeros específicos promoviendo su *decapping* y el complejo LSM2-8 asegura el correcto *splicing* de pre-mRNAs específicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

- Abbasi, N., Park, Y. Il, and Choi, S.B. (2013). RNA deadenylation and decay in plants. *J. Plant Biol.* **56**: 198–207.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., and Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256–1258.
- Audic, S. and Claverie, J.M. (1997). The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* **7**: 986–995.
- Balazadeh, S., Siddiqui, H., Allu, A.D., Matallana-Ramirez, L.P., Caldana, C., Mehrnia, M., Zanol, M.-I., Köhler, B., and Mueller-Roeber, B. (2010). A gene regulatory network controlled by the NAC transcription factor ANAC092/AtNAC2/ORE1 during salt-promoted senescence. *Plant J.* **62**: 250–264.
- Barrero, J.M., Rodríguez, P.L., Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M.R., and Micol, J.L. (2006). Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant. Cell Environ.* **29**: 2000–2008.
- Beggs, J.D. (2005). Lsm proteins and RNA processing. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 433–438.
- Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, a, Wilm, M., and Séraphin, B. (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* **19**: 1661–1671.
- Boyer, J.S. (1982). Plant Productivity and Environment. *Science* **218**: 443–448.
- Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U., and Lührmann, R. (2001). Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA* **7**: 1531–1542.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E (2000) Responses to abiotic stresses. Chapter 22. In W Gruissem, B Buchanan, R Jones, eds, Responses to Abiotic Stresses. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. 1158–1249
- Chen, J.-H., Jiang, H.-W., Hsieh, E.-J., Chen, H.-Y., Chien, C.-T., Hsieh, H.-L., and Lin, T.-P. (2012). Drought and salt stress tolerance of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase U17 knockout mutant are attributed to the combined effect of glutathione and abscisic acid. *Plant Physiol.* **158**: 340–351.
- Cheng, M.-C., Hsieh, E.-J., Chen, J.-H., Chen, H.-Y., and Lin, T.-P. (2012). *Arabidopsis* RGLG2, Functioning as a RING E3 Ligase, Interacts with AtERF53 and Negatively Regulates the Plant Drought Stress Response. *Plant Physiol.* **158**: 363–375.
- Chiba, Y., Johnson, M.A., Lidder, P., Vogel, J.T., Van Erp, H., and Green, P.J. (2004). AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*. *Gene* **328**: 95–102.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: the exosome. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**: 552–560.
- Chowdhury, A., Mukhopadhyay, J., and Tharun, S. (2007). The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *RNA* **13**: 998–1016.

- Cui, L., Shan, J., Shi, M., Gao, J., and Lin, H. (2014a). The miR156-SPL9-DFR pathway coordinates the relationship between development and abiotic stress tolerance in plants. *Plant J.* **80**: 1108–1117.
- Cui, P., Zhang, S., Ding, F., Ali, S., and Xiong, L. (2014b). Dynamic regulation of genome-wide pre-mRNA splicing and stress tolerance by the Sm-like protein LSm5 in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* **15**: R1.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.-R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**: 5–17.
- Decker, C.J. and Parker, R. (2012). P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**: a012286–a012286.
- Ding, F., Cui, P., Wang, Z., Zhang, S., Ali, S., and Xiong, L. (2014). Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in *Arabidopsis*. *BMC Genomics* **15**: 431.
- Du, J., Zhang, S., Huang, H.-W., Cai, T., Li, L., Chen, S., and He, X. (2015). The Splicing Factor PRP31 Is Involved in Transcriptional Gene Silencing and Stress Response in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **8**: 1053–1068.
- Feng, J., Li, J., Gao, Z., Lu, Y., Yu, J., Zheng, Q., Yan, S., Zhang, W., He, H., Ma, L., and Zhu, Z. (2015). SKIP Confers Osmotic Tolerance during Salt Stress by Controlling Alternative Gene Splicing in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **8**: 1038–1052.
- Filichkin, S., Priest, H.D., Megraw, M., and Mockler, T.C. (2015). Alternative splicing in plants: directing traffic at the crossroads of adaptation and environmental stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **24**: 125–135.
- Filichkin, S., Priest, H.D., Givan, S.A., Shen, R., Bryant, D.W., Fox, S.E., Wong, W., and Mockler, T.C. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*.: 45–58.
- Floris, M., Mahgoub, H., Lanet, E., Robaglia, C., and Menand, B. (2009). Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. *Int. J. Mol. Sci.* **10**: 3168–3185.
- Frey, A., Effroy, D., Lefebvre, V., Seo, M., Perreau, F., Berger, A., Sechet, J., To, A., North, H.M., and Marion-Poll, A. (2011). Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *Plant J.* **70**: 501–512.
- Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 113–126.
- Goeres, D.C., Van Norman, J.M., Zhang, W., Fauver, N.A., Spencer, M. Lou, and Sieburth, L.E. (2007). Components of the *Arabidopsis* mRNA decapping complex are required for early seedling development. *Plant Cell* **19**: 1549–64.
- Golisz, A., Sikorski, P.J., Kruszka, K., and Kufel, J. (2013). *Arabidopsis thaliana* LSM proteins function in mRNA splicing and degradation. *Nucleic Acids Res.* **41**: 1–18.

Guan, Q., Wu, J., Zhang, Y., Jiang, C., Liu, R., Chai, C., and Zhu, J. (2013). A DEAD box RNA helicase is critical for pre-mRNA splicing, cold-responsive gene regulation, and cold tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 342–356.

Hernández-Verdeja, Tamara (2015) Identificación y caracterización funcional del complejo nuclear de proteínas LSM de "*Arabidopsis thaliana*" en la respuesta de aclimatación a las temperaturas bajas. Tesis Doctoral, UCM.

Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 529–539.

Huang, C.F., Miki, D., Tang, K., Zhou, H.R., Zheng, Z., Chen, W., Ma, Z.Y., Yang, L., Zhang, H., Liu, R., He, X.J., and Zhu, J.K. (2013). A Pre-mRNA-Splicing Factor Is Required for RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **9**: e1003779.

Jeon, J., Kim, N.Y., Kim, S., Kang, N.Y., Novák, O., Ku, S.-J., Cho, C., Lee, D.J., Lee, E.-J., Strnad, M., and Kim, J. (2010). A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **285**: 23371–23386.

Jia, W., Wang, Y., Zhang, S., and Zhang, J. (2002). Salt-stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. *J. Exp. Bot.* **53**: 2201–2206.

Jiang, Y. and Deyholos, M.K. (2009). Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol. Biol.* **69**: 91–105.

Kahles, A., Ong, C.S., Zhong, Y., and Ratsch, G. (2016). SplAdder: Identification, quantification and testing of alternative splicing events from RNA-Seq data. *Bioinformatics* **32**: 1840–1847.

Kastenmayer, J.P. and Green, P.J. (2000). Novel features of the XRN-family in *Arabidopsis*: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 13985–13990.

Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J.J., Kim, K., Agarwal, M., Fu, X., Huang, A., and Zhu, J.J. (2006). The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 18816–18821.

Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., and Harter, K. (2007). The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* **50**: 347–363.

Köster, T. and Staiger, D. (2014). RNA-Binding Protein Immunoprecipitation from Whole-Cell Extracts. In *Arabidopsis Protocols*, J.J. Sanchez-Serrano and J. Salinas, eds, *Methods in Molecular Biology*. (Humana Press: Totowa, NJ), pp. 679–695.

Kreps, J. A., Wu, Y., Chang, H., Zhu, T., Wang, X., and Harper, J.F. (2002). Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.* **130**: 2129–2141.

Lee, B., Kapoor, A., and Zhu, J. (2006). STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear

protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell Online* **18**: 1736–1749.

Lee, Y. and Rio, D.C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **84**: 291–323.

Leviatan, N., Alkan, N., Leshkowitz, D., and Fluhr, R. (2013). Genome-Wide Survey of Cold Stress Regulated Alternative Splicing in Arabidopsis thaliana with Tiling Microarray. *PLoS One* **8**: e66511.

Levitt, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses: Chilling, freezing, and high temperature stresses. In *Responses of Plant to Environmental Stresses*. Academic Press, pp. 497.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009a). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078–2079.

Li, R., Yu, C., Li, Y., Lam, T.-W., Yiu, S.-M., Kristiansen, K., and Wang, J. (2009b). SOAP2: an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics* **25**: 1966–1967.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods* **25**: 402–408.

Luhua, S. et al. (2013). Linking genes of unknown function with abiotic stress responses by high-throughput phenotype screening. *Physiol. Plant.* **148**: 322–333.

Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **444**: 139–58.

Mahrez, W., Shin, J., Muñoz-Viana, R., Figueiredo, D.D., Trejo-Arellano, M.S., Exner, V., Siretskiy, A., Gruissem, W., Köhler, C., and Hennig, L. (2016). BRR2a Affects Flowering Time via FLC Splicing. *PLOS Genet.* **12**: e1005924.

Maldonado-Bonilla, L.D. (2014). Composition and function of P bodies in Arabidopsis thaliana. *Front. Plant Sci.* **5**: 201.

Matera, A.G. and Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**: 108–121.

Mayes, a E., Verdone, L., Legrain, P., and Beggs, J.D. (1999). Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO J.* **18**: 4321–4331.

Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A.M., Crosatti, C., Guerra, D., Stanca, a. M., and Cattivelli, L. (2008). Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Sci.* **174**: 420–431.

Meissner, M., Orsini, E., Ruschhaupt, M., Melchinger, A.E., Hinch, D.K., and Heyer, A.G. (2013). Mapping quantitative trait loci for freezing tolerance in a recombinant inbred line population of Arabidopsis thaliana accessions Tenela and C24 reveals REVEILLE1 as negative regulator of cold acclimation. *Plant. Cell Environ.* **36**: 1256–1267.

Merret, R., Descombin, J., Juan, Y., Favory, J.-J., Carpentier, M.-C., Chaparro, C., Charng, Y., Deragon, J.-M., and Bousquet-Antonelli, C. (2013). XRN4 and LARP1 are required for

a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress. *Cell Rep.* 5: 1279–93.

Mitsuya, S., Taniguchi, M., Miyake, H., and Takabe, T. (2005). Disruption of RCI2A leads to over-accumulation of Na⁺ and increased salt sensitivity in *Arabidopsis thaliana* plants. *Planta* 222: 1001–1009.

Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., and Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5: 621–628.

Motomura, K., Le, Q.T.N., Hamada, T., Kutsuna, N., Mano, S., Nishimura, M., and Watanabe, Y. (2015). Diffuse decapping enzyme DCP2 accumulates in DCP1 foci under heat stress in *arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 56: 107–115.

Nakaminami, K., Matsui, A., Shinozaki, K., and Seki, M. (2011). RNA regulation in plant abiotic stress responses. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 149–153.

Nilsen, T.W. and Graveley, B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 463: 457–463.

Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T. (2005). Analysis of ABA Hypersensitive Germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44: 972–984.

Noble, S.M. and Guthrie, C. (1996a). Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations. *Genetics* 143: 67–80.

Noble, S.M. and Guthrie, C. (1996b). Transcriptional pulse-chase analysis reveals a role for a novel snRNP-associated protein in the manufacture of spliceosomal snRNPs. *EMBO J.* 15: 4368–4379.

Okamoto, M., Matsui, A., Tanaka, M., Morosawa, T., Ishida, J., Iida, K., Mochizuki, Y., Toyoda, T., and Seki, M. (2016). Sm-Like Protein-Mediated RNA Metabolism Is Required for Heat Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 7: 1–11.

Pandey, G.K., Grant, J.J., Cheong, Y.H., Kim, B.G., Li, L., and Luan, S. (2005). ABR1, an APETALA2-Domain Transcription Factor That Functions as a Repressor of ABA Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 1185–1193.

Papasaikas, P., Tejedor, J.R., Vigevari, L., and Valcárcel, J. (2015). Functional Splicing Network Reveals Extensive Regulatory Potential of the Core Spliceosomal Machinery. *Mol. Cell* 57: 7–22.

Park, M.-Y., Chung, M.-S., Koh, H.-S., Lee, D.J., Ahn, S.-J., and Kim, C.S. (2009). Isolation and functional characterization of the *Arabidopsis* salt-tolerance 32 (*AtSAT32*) gene associated with salt tolerance and ABA signaling. *Physiol. Plant.* 135: 426–435.

Peng, J., Li, Z., Wen, X., Li, W., Shi, H., Yang, L., Zhu, H., and Guo, H. (2014). Salt-Induced Stabilization of EIN3/EIL1 Confers Salinity Tolerance by Deterring ROS Accumulation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 10: e1004664.

Perea-Resa, C., Carrasco-López, C., Catalá, R., Turečková, V., Novak, O., Zhang, W., Sieburth, L., Jiménez-Gómez, J.M., and Salinas, J. (2016). The LSM1-7 Complex

Differentially Regulates Arabidopsis Tolerance to Abiotic Stress Conditions by Promoting Selective mRNA Decapping. *Plant Cell* **28**: 505–520.

Perea-Resa, C., Hernández-Verdeja, T., López-Cobollo, R., del Mar Castellano, M., and Salinas, J. (2012). LSM proteins provide accurate splicing and decay of selected transcripts to ensure normal Arabidopsis development. *Plant Cell* **24**: 4930–47.

Perez-Santángelo, S., Mancini, E., Francey, L.J., Schlaen, R.G., Chernomoretz, A., Hogenesch, J.B., and Yanovsky, M.J. (2014). Role for LSM genes in the regulation of circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 15166–15171.

Pham, J., Liu, J., Bennett, M.H., Mansfield, J.W., and Desikan, R. (2012). Arabidopsis histidine kinase 5 regulates salt sensitivity and resistance against bacterial and fungal infection. *New Phytol.* **194**: 168–180.

Reddy, A.S.N., Marquez, Y., Kalyna, M., and Barta, A. (2013). Complexity of the Alternative Splicing Landscape in Plants. *Plant Cell* **25**: 3657–3683.

Reverdatto, S. V., Dutko, J. A., Chekanova, J. A., Hamilton, D. A., and Belostotsky, D. A. (2004). mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA* **10**: 1200–1214.

Roux, M.E., Rasmussen, M.W., Palma, K., Lolle, S., Regue, A.M., Bethke, G., Glazebrook, J., Zhang, W., Sieburth, L., Larsen, M.R., Mundy, J., and Petersen, M. (2015). The mRNA decay factor PAT1 functions in a pathway including MAP kinase 4 and immune receptor SUMM2. *EMBO J.* **34**: 593–608.

Rzeczkowski, K., Beuerlein, K., Müller, H., Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Kettner-Buhrow, D., Holtmann, H., and Kracht, M. (2011). c-Jun N-terminal kinase phosphorylates DCP1a to control formation of P bodies. *J. Cell Biol.* **194**: 581–596.

Schlaen, R.G., Mancini, E., Sanchez, S.E., Perez-Santángelo, S., Rugnone, M.L., Simpson, C.G., Brown, J.W.S., Zhang, X., Chernomoretz, A., and Yanovsky, M.J. (2015). The spliceosome assembly factor GEMIN2 attenuates the effects of temperature on alternative splicing and circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**: 9382–9387.

Schoenberg, D.R. and Maquat, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **13**: 246–259.

Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61–72.

Sheth, U. and Parker, R. (2003). Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. *Science* **300**: 805–808.

Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 410–417.

Siwaszek, A., Ukleja, M., and Dziembowski, A. (2014). Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems. *RNA Biol.* **11**: 1122–1136.

Smith, C.W., Patton, J.G., and Nadal-Ginard, B. (1989). Alternative splicing in the control

of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 527–577.

Soma, F., Mogami, J., Yoshida, T., Abekura, M., Takahashi, F., Kidokoro, S., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). ABA-unresponsive SnRK2 protein kinases regulate mRNA decay under osmotic stress in plants. *Nat. Plants* **3**: 16204.

Staiger, D. (2015). Shaping the Arabidopsis Transcriptome through Alternative Splicing. *Adv. Bot.* **2015**: 419428.

Staiger, D. and Brown, J.W.S. (2013). Alternative Splicing at the Intersection of Biological Timing, Development, and Stress Responses. *Plant Cell* **25**: 3640–3656.

Steffens, A., Bräutigam, A., Jakoby, M., and Hülskamp, M. (2015). The BEACH Domain Protein SPIRRIG Is Essential for Arabidopsis Salt Stress Tolerance and Functions as a Regulator of Transcript Stabilization and Localization. *PLoS Biol.* **13**: e1002188.

Streitner, C., Köster, T., Simpson, C.G., Shaw, P., Danisman, S., Brown, J.W.S., and Staiger, D. (2012). An hnRNP-like RNA-binding protein affects alternative splicing by in vivo interaction with transcripts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **40**: 11240–11255.

Sun, J., Jiang, H., Xu, Y., Li, H., Wu, X., Xie, Q., and Li, C. (2007). The CCCH-type zinc finger proteins AtSZF1 and AtSZF2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **48**: 1148–1158.

Suzuki, Y., Arae, T., Green, P.J., Yamaguchi, J., and Chiba, Y. (2015). AtCCR4a and AtCCR4b are involved in determining the poly(A) length of granule-bound starch synthase 1 transcript and modulating sucrose and starch metabolism in *arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **56**: 863–874.

Tan, B.-C., Joseph, L.M., Deng, W.-T., Liu, L., Li, Q.-B., Cline, K., and McCarty, D.R. (2003). Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9 -cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* **35**: 44–56.

Tharun, S. (2009). Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **272**: 149–189.

Tharun, S., He, W., Mayes, a E., Lennertz, P., Beggs, J.D., and Parker, R. (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **404**: 515–518.

Thomashow, M.F. (1999). Plant cold accliation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 571–599.

Thoms, M., Thomson, E., Baßler, J., Gnädig, M., Griesel, S., and Hurt, E. (2015). The Exosome Is Recruited to RNA Substrates through Specific Adaptor Proteins. *Cell* **162**: 1029–1038.

Tran, L.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S.D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-shinozaki, K. (2004). Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* **16**: 2481–2498.

Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: Discovering splice junctions

with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**: 1105–1111.

Turečková, V., Novák, O., and Strnad, M. (2009). Profiling ABA metabolites in *Nicotiana tabacum* L. leaves by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta* **80**: 390–399.

Tuteja, N. (2007). Absciscic Acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal. Behav.* **2**: 135–138.

Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J.-K., and Surekha, K.-A. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* **45**: 523–39.

Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**: 701–718.

Walley, J.W., Kelley, D.R., Nestorova, G., Hirschberg, D.L., and Dehesh, K. (2010). Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. *Plant Physiol.* **152**: 866–875.

Wu, Y., Deng, Z., Lai, J., Zhang, Y., Yang, C., Yin, B., Zhao, Q., Zhang, L., Li, Y., Yang, C., and Xie, Q. (2009). Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res.* **19**: 1279–1290.

Xiong, L., Gong, Z., Rock, C.D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D., and Zhu, J.-K. (2001). Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Dev. Cell* **1**: 771–781.

Xu, J. and Chua, N.-H. (2009). Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *Plant Cell* **21**: 3270–3279.

Xu, J. and Chua, N.-H. (2012). Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *EMBO J.* **31**: 1975–1984.

Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell* **18**: 3386–3398.

Yang, M., Zhang, B., Jia, J., Yan, C., Habaïke, A., and Han, Y. (2013). RRP41L, a putative core subunit of the exosome, plays an important role in seed germination and early seedling growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **161**: 165–178.

Yu, H., Tian, C., Yu, Y., and Jiao, Y. (2016). Transcriptome survey of the contribution of alternative splicing to proteome diversity in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant* **9**: 749–752.

Zhang, X. and Guo, H. (2017). mRNA decay in plants: both quantity and quality matter. *Curr. Opin. Plant Biol.* **35**: 138–144.

Zhang, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X., Li, D., Li, Q., Yue, M., Zhang, Y. -e., Xu, Y., Xue, Y., Chong, K., and Bao, S. (2011). Arabidopsis Floral Initiator SKB1 Confers High Salt Tolerance by Regulating Transcription and Pre-mRNA Splicing through Altering Histone H4R3 and Small Nuclear Ribonucleoprotein LSM4 Methylation. *Plant Cell* **23**: 396–411.

7. ANEXO I: ABREVIATURAS

7. Abreviaturas empleadas en esta tesis

5'CAP	Caperuza N7-metilguanosina en el extremo 5' de un mRNA
5'RACE	Amplificación rápida del extremo 5' del cDNA (<i>5' Rapid Amplification of cDNA ends</i>)
A	Adenina
ABA	Ácido abscísico
Ác	Ácido
ANOVA	Análisis de varianza (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHX	Cicloheximida
<i>Decapping</i>	Eliminación de la estructura 5'CAP
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNaseI	Desoxirribonucleasa I
DTT	Ditiotreitol
EE	Exclusión de exón
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
Fig	Figura
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescence Protein</i>)
G	Guanina
hnRNP	Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas
kDa	KiloDalton
mRNA	RNA mensajero
p	Peso
<i>P-bodies</i>	Corpúsculos de procesamiento
PA	Intrones procesados alternativamente
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC	Intrones procesados constitutivamente
PEG	Polietilenglicol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i>)
poli (A)	Serie de 80 a 250 residuos de A en el extremo 3' de un mRNA
PR	Punto de ramificación
Pre-mRNA	Precursor de mRNA
PVDF	Polifluoruro de vinilideno (<i>Polyvinylidene difluoride</i>)
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (<i>Quantitative Polymerase reaction chain</i>)

RBP	Proteína de unión a RNA (<i>RNA Binding Protein</i>)
RFP	Proteína fluorescente roja (<i>Red Fluorescence Protein</i>)
RI	Retención de intrón
RIP	Inmunoprecipitación de RNA in vivo (<i>RNA ImmunoPrecipitation</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Secuenciación masiva de RNA (<i>RNA-sequencing</i>)
RNP	Complejo ribonucleoproteico
RPKM	<i>Reads Per Kilobase per Million reads</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SA	<i>Splicing</i> alternativo
SDS	Dodecilsulfato sódico
snRNA	RNA nuclear pequeño (<i>small nuclear RNA</i>)
snRNP	RNP nuclear pequeño (<i>small nuclear RNP</i>)
<i>Splicing</i>	Corte y empalme de RNA
SR	Proteínas ricas en residuos de Serina/Arginina
SS3'	Sitio de <i>splicing</i> en 3'
SS5'	Sitio de <i>splicing</i> en 5'
U	Unidad de actividad enzimática
u.r.	Unidades relativas
v	Volumen
XRN	Exoribonucleasa

8. RESUMEN

Regulación diferencial del metabolismo de mRNAs por los complejos LSM en la tolerancia a estreses abióticos en *Arabidopsis thaliana*

Las plantas, a lo largo de su ciclo de vida, se ven constantemente sometidas a condiciones ambientales adversas, como la sequía, la salinización de los suelos o las heladas. Dada su naturaleza sésil, para poder sobrevivir, las plantas perciben y responden a esas situaciones adaptando su desarrollo mediante una serie de ajustes fisiológicos y bioquímicos. La mayor parte de dichos ajustes están controlados a través de cambios en la expresión génica y, en los últimos años, distintos resultados indican que esos cambios, a su vez, están regulados, de manera significativa, a nivel post-transcripcional.

En las células, las poblaciones de RNAs mensajeros (mRNAs) están controladas finamente a lo largo de la maduración de sus precursores (pre-mRNAs). En este sentido, la degradación y el *splicing* de mensajeros son importantes mecanismos postranscripcionales que pueden determinar los patrones de expresión génica que median la adaptación de las plantas a distintas condiciones de estrés abiótico. Entre los factores que juegan un papel clave en estos procesos se encuentran las proteínas de la familia LSM, constituida por ocho miembros principales (LSM1 a LSM8) muy conservados en eucariotas. La reciente caracterización de estas proteínas en *Arabidopsis* ha revelado que, al igual que en animales y levaduras, las plantas tienen ocho proteínas LSM que se organizan en dos complejos heteroheptaméricos con función y localización subcelular diferentes. El complejo LSM1-7, definido por la proteína LSM1, se localiza en el citoplasma y es un componente esencial de la maquinaria de *decapping* que activa la escisión de la estructura 5'CAP y la consiguiente degradación de mRNAs. Por el contrario, el complejo LSM2-8, definido por la proteína LSM8, se encuentra en el núcleo donde forma parte del espliceosoma controlando la estabilización del U6 snRNA y, por tanto, juega un papel fundamental en el *splicing* de los pre-mRNAs.

Resultados recientes de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que los complejos LSM1-7 y LSM2-8 de *Arabidopsis* regulan negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas controlando parte de la expresión génica que se induce durante este proceso. Curiosamente, los complejos LSM realizan este control mediante su interacción con mensajeros particulares para regular tanto su degradación como su procesamiento. La implicación de estos complejos en la tolerancia a las heladas sugiere que también podrían regular la tolerancia de *Arabidopsis* a otros estreses abióticos relacionados como la sequía y el estrés salino, controlando diferencialmente la expresión génica a través de la selección de mensajeros específicos relacionados con la respuesta a esos estreses. Con el fin de

comprobar esta hipótesis, en esta tesis planteamos los siguientes objetivos: i) Determinar la implicación de los complejos LSM en la tolerancia de *Arabidopsis* a la sequía y al estrés salino; ii) Caracterizar la función molecular de los complejos LSM en la respuesta de *Arabidopsis* a la sequía y al estrés salino y iii) Determinar la capacidad de los complejos LSM para seleccionar mensajeros diana específicos, dependiendo de las condiciones de estrés ambiental. Los resultados obtenidos han revelado que, efectivamente, los complejos LSM regulan diferencialmente la tolerancia de *Arabidopsis* a distintos estreses abióticos, controlando la expresión de un grupo particular de genes implicados en estas respuestas adaptativas. Notablemente, además, nuestros resultados demuestran que estos complejos ejercen ese control diferencial de la expresión génica mediante la degradación y el procesamiento de mensajeros específicos, dependiendo del entorno en que se encuentran las plantas. Las funciones puestas de manifiesto en este trabajo para los complejos LSM de *Arabidopsis*, representan un nuevo nivel de regulación postranscripcional en eucariotas que parece esencial para su correcta adaptación a diferentes condiciones ambientales.

9. SUMMARY

Differential regulation of mRNAs metabolism by LSM complexes in *Arabidopsis thaliana* tolerance to abiotic stresses

Throughout their life cycle, plants are continuously exposed to adverse environmental conditions including drought, soil salinization or freezing temperatures. Because of their sessile nature, to survive, plants must perceive and respond to such adverse conditions by adapting their development through different physiological and biochemical adjustments. Most of these adjustments are controlled by changes in gene expression and several lines of evidence indicate that these changes are regulated to a great extent at the post-transcriptional level.

In the cells, messenger RNAs (mRNAs) populations are regulated at several stages during the maturation of their precursor mRNAs (pre-mRNAs). In this context, mRNAs degradation and splicing are relevant post-transcriptional regulatory mechanisms that may control gene expression during plant adaptation to abiotic stresses. Among the factors that play a key role in such processes are the LSM proteins, a small family of eight proteins (from LSM1 to LSM8) highly conserved in eukaryotes. The characterization of these proteins in *Arabidopsis thaliana* has revealed that, like in animals and yeasts, plant LSM are organized in two heteroheptameric complexes. The LSM1-7 complex, which is defined by the presence of the LSM1 protein, is localized in the cytoplasm and constitutes an essential component of the decapping machinery that activates the 5'-cap cleavage of mRNAs leading to their degradation. The LSM2-8, which is defined by the LSM8 protein, is specifically localized in the nucleus and is a core component of the spliceosomal machinery responsible for the stabilization of the U6 snRNA which controls pre-mRNA splicing.

Recent results obtained in our lab uncovered that both the cytosolic LSM and the nuclear LSM complexes are negative regulators of the cold acclimation process by regulating cold-induced gene expression. Intriguingly, in both cases cold acclimation seems to rely on the specific interaction of the LSM complex with particular transcripts to mediate their degradation or splicing. These findings motivated a new hypothesis stating that the LSM complexes regulate the tolerance to other, related, abiotic stresses such as drought and high salt by regulating gene expression through the selection of specific transcripts involved in these stress responses. To examine this hypothesis, we proposed the following objectives i) To determine the involvement of *Arabidopsis* LSM complexes in drought and salt stress tolerance ii) To characterize the molecular function of LSM complexes in *Arabidopsis* tolerance to drought and salt stress and iii) To determine the capacity of LSM complexes to select specific transcripts depending on the environmental conditions.

The results obtained in this work, reveal that the LSM complexes differentially regulate the tolerance to abiotic stresses through the regulation of the expression of particular gene sets that are involved in plant adaptation to such stresses. Importantly, our data demonstrate that the differential regulation of gene expression is attained through the control of the degradation or splicing of specific transcripts depending on the environmental conditions. The unveiled functions for the LSM complexes represent a novel layer of post-transcriptional regulation that is essential for plant adaptation to changes in the environment.

